STRUKTURELLE UND FUNKTIONELLE ASPEKTE EINIGER NIEDERMOLEKULARER KUPFERKOMPLEXE ALS MODELLE DER METALLBINDUNGSZENTREN VON Cu_2Zn_2- SUPEROXIDDISMUTASE UND Cu(I)-THIONEIN

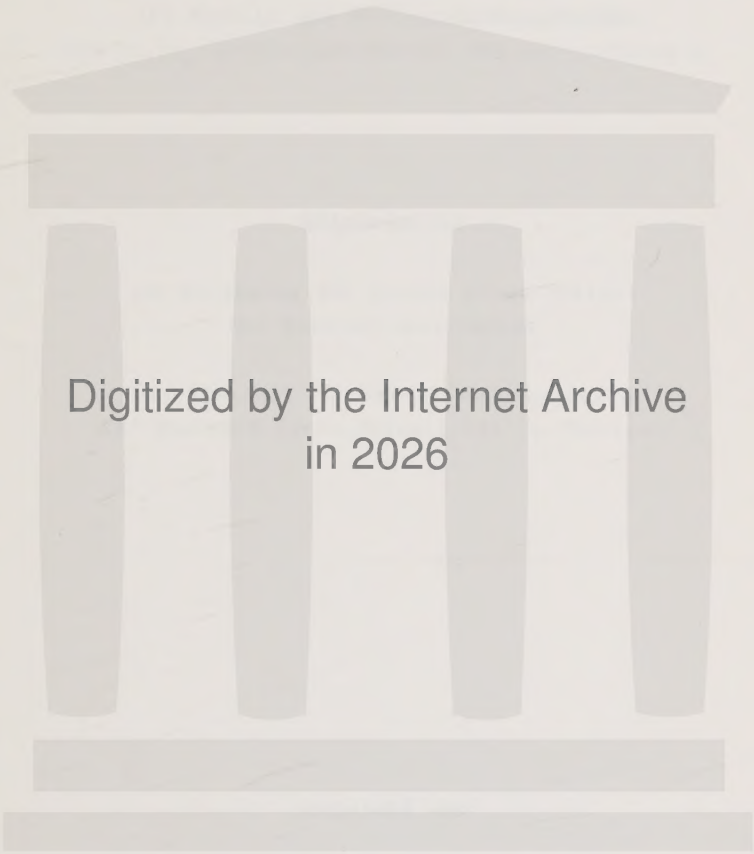
DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Margot Linß
aus Bayreuth

1986


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543903_0099

STRUKTURELLE UND FUNKTIONELLE ASPEKTE EINIGER NIEDERMOLEKULARER KUPFERKOMPLEXE ALS MODELLE DER METALLBINDUNGSZENTREN VON Cu_2Zn_2-SUPEROXIDDISMUTASE UND Cu(I)-THIONEIN

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Margot Linß
aus Bayreuth

1986

Tag der mündlichen Prüfung : 19. Dezember 1986

Dekan :	Prof. Dr. D. Mecke
1. Berichterstatter :	Prof. Dr. U. Weser
2. Berichterstatter :	Prof. Dr. J. Strähle

Diese Arbeit wurde auf Anregung von Prof. Dr. U. Weser, Anorganische Biochemie am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen angefertigt.

Herrn Prof. Weser danke ich für die Überlassung des Themas und des Arbeitsplatzes sowie für die freundliche Unterstützung und ermutigende Diskussion der Versuche. Den Mitarbeitern des Arbeitskreises Anorganische Biochemie möchte ich nicht nur für ihre Ratschläge und ihre Hilfe danken, sondern auch für die vielen wertvollen Stunden, die ich mit ihnen verbringen durfte.

Die Deutsche Forschungsgemeinschaft hat Teile dieser Arbeit durch Personal- und Sachmittel an Prof. Dr. Weser unterstützt.

INHALT

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
1.1	Cu_2Zn_2-Superoxiddismutase	3
1.2	Cu(I)-Thionein	6
1.3	Engere Problematik	8
1.3.1	Cu_2Zn_2-Superoxiddismutasemodelle	8
1.3.2	Cu(I)-Thioneinmodelle	9
2.	EXPERIMENTELLES	11
2.1	Materialien	11
2.1.1	Chemikalien	11
2.1.2	Geräte	12
2.2	Elementaranalysen	13
2.3	Spektrometrie	13
2.3.1	Infrarotspektrometrie	13
2.3.2	Elektronenabsorption	13
2.4	Cyclische Voltammetrie	14
2.5	Stabilitätskonstanten	16
2.6	Superoxiddismutaseaktivität	21
2.7	Arbeitsvorschriften	21
2.7.1	Cu_2Zn_2-Superoxiddismutasemodelle	21
2.7.1.1	(3-(2-Pyridylethyl(imino)[(1.3-diphenyl) prop-1-enonato]-(N,N'O))Kupfer(II), Perchlorat oder $CuL_{py}ClO_4xH_2O$, I	21
2.7.1.2	(3-(2-Pyridylethylimino)[(1.3-diphenyl) prop-1-enonato]-(N,N',O))Kupfer(II), Nitrat oder $CuL_{py}NO_3xH_2O$, II	22
2.7.1.3	(3-(4-Imidazolylethylimino)[(1.3-diphenyl)prop-1-enonato]-(N,N',O))Kupfer(II), Perchlorat oder $CuL_{hm}ClO_4xH_2O$, III	22
2.7.1.4	([1.8-Di(2-pyridyl)-2.7-diazaoctadien-1.7]-(N,N',N",N'"))Kupfer(II), Diperchlorat oder $CuL_{1.4py}(ClO_4)_2xl/2H_2O$,IV	23
2.7.1.5	([1.7-Di(2-pyridyl)-2.6-diazaheptadien-1.6]-(N,N'N",N'"))Kupfer(II), Diperchlorat oder $CuL_{1.3py}(ClO_4)_2$, (V)	23

		Seite
2.7.1.6	([1.8-Bis(2-pyridyl)-2.7-diazaoctan]-(N,N',N",N'"))Kupfer(II), Diperchlorat oder $CuL_{NHpy}(ClO_4)_2 x 1/2H_2O$, VI	24
2.7.1.7	([1.8-Di(2-imidazolyl)-2.7-diazaoctadien-1.7]-(N,N'N",N"'))Kupfer(II), Diperchlorat oder $CuL_{1.4im}(ClO_4)_2 x 1/2H_2O$, VII	24
2.7.1.8	([1.7-Di(2-imidazolyl)-2.6-diazaheptadien-1.6]-(N,N',N",N'"))Kupfer(II), Diperchlorat oder $CuL_{1.3im}(ClO_4)_2 x 1.5H_2O$, VIII	25
2.7.2	Cu(I)-Thioneinmodell	25
2.7.2.1	Tetraacetonitrilokupfer(I)nitrat	25
2.7.2.2	$(Me_4N)_2[Cu_4(C_8H_8-(CH_2-S)_2)_3]$	26
3.	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	27
3.1	Zur gezielten Synthese von Superoxid-dismutasemodellen	27
3.1.1	Reaktion einer Dicarbonylverbindung mit einem primären Amin.	29
3.1.1.1	Reaktion ohne Templat	29
3.1.1.2	Reaktion als Templat	31
3.1.2	Reaktion einer Carbonylverbindung mit einem aliphatischen primären Amin	32
3.1.2.1	$CuL_{1.4py}(ClO_4)_2 x 1/2H_2O$,N IV	32
3.1.2.2	$CuL_{1.3py}(ClO_4)_2$, V	33
3.1.2.3	$CuL_{NHpy}(ClO_4)_2 x 1/2H_2O$, VI	33
3.1.2.4	$CuL_{1.4im}(ClO_4)_2 x 1/2H_2O$, VII und $CuL_{1.3im}(ClO_4)_2 x 1.5H_2O$ VIII	34
3.1.3	Infrarotspektroskopie	35
3.1.4	UV/vis-Spektroskopie	41
3.1.5	EPR-Spektroskopie	46
3.1.6	Cyclische Voltammetrie	5o
3.1.7	Stabilität der Komplexe	53
3.1.8	Enzymaktivität der Komplexe	55
3.2	Cu(I)-Thioneinmodell	57
3.2.1	$(Me_4N)_2[Cu_4(C_8H_8-(CH_2S)_2)_3]$	57
3.3	Zur Problematik niedermolekularer Modelle von Cu-Proteinen	59

		Seite
4.	ZUSAMMENFASSUNG	6o
4.1	Cu_2Zn_2-Superoxiddismutasemodelle	6o
4.2	Cu(I)-Thioneinmodell	62
5.	LITERATUR	64

ABKÜRZUNGEN

abs.	absolut
BSA	Rinderserumalbumin
ber.	berechnet
C	Konzentration
CD	Circulardichroismus
EPR	Electron paramagnetic resonance, Elektronenspinresonanz
EXAFS	Extended x-ray absorption fine structure
gef.	gefunden
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
IR	Infrarot
Lys	Lysin
m	mittel
Me_4N	Tetramethylammonium
MeOH	Methanol
NBT	Nitrotetrazoliumblauchlorid
NMR	Nuclear magnetic Resonance, Kernresonanz
rel.	relativ
schw	schwach
SOD	Superoxiddismutase
st	stark
sst	sehr stark
Tyr	Tyrosin
UV	Ultraviolett
vis	visible, sichtbarer Spektralbereich

1. EINLEITUNG

Die lebende Zelle funktioniert aufgrund eines komplizierten Systems chemischer Vorgänge. Metalle und anorganische Verbindungen spielen dabei eine entscheidende Rolle im funktionell intakten Organismus. In ihren Untersuchungen über molekulare Details von Enzymen und anderen biologisch aktiven Substanzen zeigen Biochemiker zunehmend Interesse an Eigenschaften und Reaktionen von anorganischen Verbindungen, besonders von Metallkomplexen. Neuere Entwicklungen führten zu einem besseren Verstehen von Bindung, Struktur und Reaktivität von Koordinationsverbindungen. Auf der anderen Seite beginnen auch anorganische Chemiker Analogien zu entdecken zwischen synthetischen und biologischen metallhaltigen Stoffen. Aus diesen beiden klassischen Bereichen der Chemie, der Biochemie und der anorganischen Chemie hat sich ein neues, aufregendes Forschungsgebiet entwickelt, die anorganische Biochemie.

Informationen über geometrische und elektronische Strukturen des aktiven Zentrums von einem Protein sind durch die zur Zeit vorhandenenMeßmethoden limitiert. Nur wenige Metallproteine können in kristalliner Form gewonnen und somit röntgenographisch vermessen werden. Bei indirekten spektroskopischen Methoden gelangt man nicht selten aufgrund des niedrigen Metallgehalts bezogen auf das Molekulargewicht an die Nachweisgrenze. Ein Weg um Aufschluß zu erhalten über die erste Koordinationssphäre um das Metall ist die gezielte Synthese von niedermolekularen Modellen bekannter Struktur und ein Vergleich der spektroskopischen Eigenschaften mit denen des Proteins. Aber auch bei bekannter Struktur bietet die Korrelation der Struktur mit der biologischen Funktion und deren Mechanismus ein weites Feld für Untersuchungen.

Der Einfluß der Proteinhülle auf das aktive Zentrum ist nicht zu unterschätzen. Durch die Quartärstruktur der Proteinmatrix wird eine definierte chemische Umgebung um das aktive Zentralion geschaffen, die für die ungewöhnlichen Eigenschaften des Metalls verantwortlich sind und als niedermolekulares Modell nur sehr schwierig oder überhaupt nicht nachzubauen sind. Beispielsweise ist es bis jetzt noch nicht gelungen, den ungewöhnlich hohen Extinktionskoeffizienten von 4ooo - 1oooo $M^{-1}cm^{-1}$ der Absorptionsbande bei 6oo nm der Typ I oder "blauen" Kupferproteine wie Azurin, Plastocyanin oder Stellacyanin |1| mit einem niedermolekularen Komplex zu erreichen. Die sterische Verfügbarkeit der koordinierenden Liganden hat einen größeren Effekt als die thermodynamische Stabilität der Komplexbildung. Das Protein gibt Bindungsabstände, Bindungswinkel und auch Koordinationszahlen vor und beeinflußt dadurch wesentlich die Eigenschaften des Metalls. Eine bestimmte definierte Ladungsverteilung auf der Proteinoberfläche fördert gezielt den Transport des Substrats zum aktiven Zentrum. Dieses Phänomen läßt sich mit niedermolekularen Modellen kaum simulieren. Die Reaktion zwischen Modell und Substrat basiert auf statistischer Verteilung und Diffusion durch das Medium.

Als Modelle können auch Metallœnzyme bezeichnet werden, deren natives Metall durch ein anderes Metall substituiert wird. Diese Methode liefert Informationen über die direkte Umgebung von Metallen, die mit gängigen spektroskopischen Methoden nicht erfaßbar sind. Cu(I)- oder Zn(II)-Metalloproteine, beides d^{10}-Metalle, die keine d-d-Übergänge im sichtbaren Bereich aufweisen und keine ungepaarten Elektronen zur EPR-Detektion besitzen, lassen sich durch Substitution von spektroskopisch aktiven Metallen wie Mn(II) oder Co(II) in ein spektroskopisch effektives Modell überführen. Die Schwierigkeit besteht darin, sicherzustellen daß das substituierte Metall die Stelle des nativen Metalls besetzt. Aber die spezifische

Metallbindungsstelle in Metalloproteinen ist um Größenordnungen stabiler als die potentiellen Metallkoordinationsstellen des restlichen Proteins. Aufgrund von EXAFS-Messungen wurde für Hefe-Cu(I)-Thionein angenommen, daß das Metall von vier Thiolatschwefeln umgeben ist |2|. Niedermolekulare tetraedrische Kupferthiolatkomplexe konnten bis jetzt noch nicht synthetisiert werden. Die maximale Koordinationszahl ist drei in trigonal planarer Anordnung. Im Protein konnte aber das Cu(I) durch Co(II) substituiert werden |3|. Die Charge-Transfer-Banden und d-d- Übergänge des Elektronenspektrums bestätigten die ungewöhnliche tetraedrische Koordination um das Metall.

1.1 Cu_2Zn_2-Superoxiddismutase

Bereits 1939 isolierten T.Mann und D.Keilin |4| aus Rindererythrozyten ein Kupferprotein, das sie "Hemocuprein" nannten. 2o Jahre Später wurde aus Humanerythrozyten ein "Erythrocuprein" präpariert |5,6|. Ebenso wurde im menschlichen Gehirn entsprechend "Cerebrocuprein" |7| gefunden und in der Leber von Rind |4| und Pferd |8| "Hepatocuprein". Alle diese Proteine hatten ein Molekulargewicht um 3oooo und etwa zwei Kupfer pro Mol. 1969 fanden I. McCord und I. Fridovich |9| für diese Proteine eine enzymatische Funktion. Sie zeigten, daß diese Kupferproteine die Disproportionierung bzw. Dismutation von Superoxidradikalen zu Sauerstoff und Wasserstoffperoxid protonenabhängig katalysieren (Gleichung 1).

$$O_2^- + O_2^- + 2H^+ \longrightarrow O_2 + H_2O_2 \qquad (1)$$

Entsprechend dieser Reaktion wurden die Kupferproteine unter dem Namen Superoxiddismutase zusammengefaßt. Inzwischen sind Superoxiddismutasen in nahezu allen Geweben von Eukaryonten nachgewiesen worden |1o|.

Cu_2Zn_2-Superoxiddismutase gehört zu dem Typ II oder "nicht blauen" Kupferproteinen. Am besten untersucht ist die

Cu_2Zn_2-Superoxiddismutase aus Rindererythrozyten. Die Aminosäuresequenz ist bekannt |11|, und da die Superoxiddismutase zu den wenigen Proteinen gehört, die relativ leicht kristallisieren, ist die Röntgenstruktur bis zu einer Auflösung von 2Å aufgeklärt |12,13|. Sie besitzt ein Molekulargewicht von 31300d und ist dimer. Die beiden Untereinheiten sind über hydrophobe Wechselwirkungen zusammengehalten, und jede Untereinheit besitzt ein aktives Zentrum bestehend aus einem Kupfer und einem Zink an der Oberfläche des Moleküls. Das Kupfer ist verzerrt quadratisch planar koordiniert von den Imidazolstickstoffen der Histidine 69 und 78 und der Carboxylatgruppe der Asparaginsäure 81 (Abb.1).

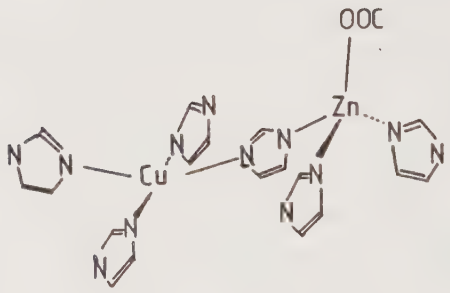


Abb.1 Schematische Zeichnung des aktiven Zentrums der Cu_2Zn_2-Superoxiddismutase

Die Oberfläche der SOD ist bei physiologischen pH-Werten negativ geladen |14|. Nur ein kleiner Trichter, der zum aktiven Zentrum führt, trägt positivgeladene Aminosäurereste, die das Superoxidanion zum Kupfer hinführen |16|. Während des enzymatischen Reaktionscyclus wird das Kupfer abwechselnd reduziert und wieder reoxidiert |17,18|. Der Mechanismus gilt als gesichert |13.19|. Der Redoxwechsel erfolgt über einen Inner-Sphere-Mechanismus, bei dem das Substrat direkt an das Metall koordiniert ist. Die Gesamt-

reaktion ist in Gleichung 2 und 3 dargestellt.

$$SOD\text{-}Cu(II) + O_2^- + H^+ \longrightarrow SOD'\text{-}Cu(I) + O_2 \quad (2)$$

$$SOD'\text{-}Cu(I) + O_2^- + H^+ \longrightarrow SOD\text{-}Cu(II) + H_2O_2 \quad (3)$$

Das Superoxidradikal verdrängt ein Wassermolekül in axialer Position des Kupfers, wobei ein Sauerstoff an das Metall und der andere über eine Wasserstoffbrücke an Arginin-141 gebunden wird. Unter Aufbrechen der Brücke zum Histidin-61 wird das Kupfer reduziert und der gebildete Sauerstoff freigesetzt. Das Zink beeinflußt den pK_a des Imidazolstickstoffs, so daß dieser protoniert wird. Bei physiologischem pH liegt aber Histidin-61 ohnehin teilweise protoniert vor. Folglich ist das Zink zwar nicht essentiell für die Reaktion, ist aber dafür verantwortlich, daß die Aktivität vom zinkfreien Protein viel stärker pH-abhängig ist, als die von nativer Superoxiddismutase |15,2o|.

Das zweite Superoxidradikal bindet an das reduzierte Kupfer, wobei das Histidin-61 ein Proton zur Verfügung stellt, das zweite Proton ein Wassermolekül. Nach der Reoxidation zu Kupfer(II) wird das ungeladene Wasserstoffperoxid freigesetzt.

Erheblich unterschiedliche Werte des Redoxpotentials für Cu_2Zn_2-Superoxiddismutase wurden veröffentlicht |21-23|. Diese Differenz ist auf unterschiedliche Meßmethoden zurückzuführen und auf ein anomales Verhalten des Enzyms. Lawrence und Sawyer |21| bestimmten das Redoxpotential durch indirekte coulometrische Titration mit einer Glaskohleelektrode als Arbeitselektrode und ermittelten +o.27V. Wird jedoch das vollständig reduzierte Enzym zurücktitriert mit $K_3Fe(CN)_6$, so läßt sich ein Potential von +o.4oV ermitteln |22,23|. Dabei ist zu bemerken, daß bei der Rücktitration nur noch 7o% der Ausgangskonzentration an Cu(II) zurückerhalten werden und 3o% des Ferricyanids bleiben unverbraucht.

1.2 Cu(I)-Thionein

Aus Bierhefe (saccharomyces cerevisiae) wurde ein kupferbindendes Protein isoliert |24,25|, das aufgrund seiner chemischen und spektroskopischen Eigenschaften in die Klasse der Metallothioneine eingeordnet wurde. Eine Aminosäureanalyse |26| ergab eine relative Molekülmasse M_r von 4800 Dalton und 4 g Atom Kupfer pro Molekül. Das Kupfer liegt ausschließlich in der Oxidationsstufe + I vor |25|. Auffallend ist der hohe Anteil saurer Aminosäuren. Die Sequenz enthält keine aromatischen Aminosäuren, außer einem Histidin, das nicht mit dem Metall verbunden ist, wie ein 360 MHz ^{1}H-NMR-Spektrum beweist |27|. Außer acht Cysteinresten wurden keine weiteren schwefelhaltigen Aminosäuren gefunden, und es war kein labiler, anorganischer Schwefel nachweisbar. Alle Thiolatgruppen der Cysteinreste sind direkt an das Metall gebunden |28|, woraus eine Cu:S-Stöchiometrie von 4:8 bzw. 1:2 resultiert. Eine EXAFS-Röntgenabsorptionsspektrometrie zeigt, daß das Kupfer von vier Thiolatschwefeln umgeben ist, mit zwei verschiedenen Cu-S-Abständen von 2.22 Å und 2.36 Å |29|. Die räumliche Anordnung des Kupfer-Bindungszentrums ist umstritten. Ein plausibles Modell, das allen bis jetzt zur Verfügung stehenden Teilinformationen über das Metallbindungszentrum des Cu-Thioneins gerecht wird, ist ein Cu-S-Cubangerüst |29|. Die Ecken eines Würfels sind alternierend mit Cu^+ und Thiolatschwefel besetzt, der eine Brückenfunktion zwischen den Cu-Atomen einnimmt. Zusätzlich ist jedes Kupferatom endständig mit einem Cysteinrest verbunden.

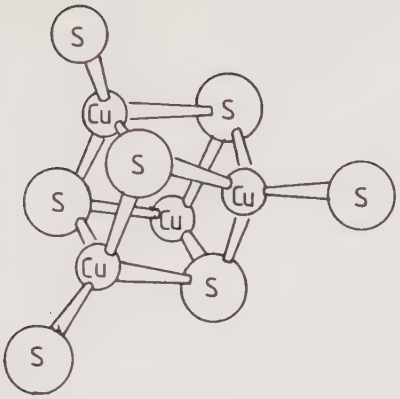


Abb.2 Cu_4S_8-Cubanmodell |29|

Der andere Strukturvorschlag, ein adamantan-ähnliches Kupfer-Schwefel-Gerüst basiert auf EXAFS-Untersuchungen |3o| eines lysosomalen Metallothioneins, isoliert aus der Leber von Bedlington-Terriern |31| und einem Vergleich der Cu-S- und Cu-Cu-Bindungslängen mit Thiolatclustern bekannter Struktur.

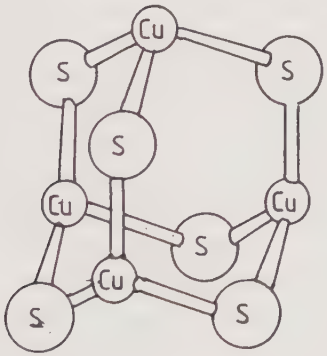


Abb.3 Cu_4S_6-Adamantanmodell

Die EXAFS-Daten bestätigen jedoch das Ergebnis der EXAFS-Messung am Hefe-Cu(I)-Thionein, daß das Kupfer vierfach von Thiolatschwefeln koordiniert ist. Der Cu-S-Abstand beträgt 2.27 ± 0.02Å.

Die biologische Funktion der Metallothioneine ist noch nicht geklärt. Es wird vermutet, daß sie eine Rolle spielen bei der Detoxifizierung von Schwermetallen |32| oder als Metalltransferprotein zur Synthese anderer Metalloproteine |33,34|

1.3 Engere Problematik

1.3.1 Cu_2Zn_2-Superoxiddismutasemodelle

Die katalysierende Wirkung auf die Superoxiddismutasereaktion beschränkt sich nicht nur auf das spezifisch proteingebundene Kupfer. Sogar freies Cu^{2+} vermag die spontane Dismutation von Superoxid zu beschleunigen |16,36|, jedoch nur in stark saurem Medium. Einige Cu-Aminosäurekomplexe |37,38|, sowie Komplexe mit verschiedenen Carboxylsäuren, darunter Acetate |39.4o|, Indomethacinat |41| und Salicylate |42,43| sind bei pH 7 enzymatisch aktiv. Der Modellcharakter dieser Verbindungen wird allein mit der katalytischen Funktion des nativen Proteins verglichen. Diese Modelle sind keine Strukturanaloga. Außerdem sind sie in der reduzierten Cu(I)-Form in wäßriger Lösung nicht stabil. Das relativ hohe Redoxpotential der Cu_2 Zn_2-Superoxiddismutase von +26o mV |21| verweist auf eine hohe Stabilisierung der Oxidationsstufe + I durch die Proteinmatrix. Die Umgebung des Kupfers ist flexibel genug, einen Wechsel der Geometrie der koordinierten Atome von tetraedrisch im Falle von Cu(I) zu verzerrt quadratisch planar bei Cu(II) zuzulassen, ohne das Metall zu verlieren. Die niedermolekularen Modelle sollen nicht nur die Struktur der ersten Koordinationssphäre wiedergeben, sondern auch effiziente Katalysatoren darstellen. Das Zink ist am Katalysecyclus nicht direkt meßbar beteiligt und hat auf die Enzymaktivität keinen Einfluß |15,44|. Das Derivat Cu_2Cu_2-Superoxiddismutase mit einem binuklearen, imidazolverbrückten Kupferzentrum ist in Gegenwart von Thiocyanat katalytisch aktiv unter Bedingungen, unter denen die Imidazolatbrücke aufgebrochen ist |45|.

Folglich ist eine intakte Brücke nicht essentiell für die Enzymaktivität. Das Design der Superoxiddismutasemodelle in dieser Arbeit beschränkt sich deshalb auf mononukleare, vierfach stickstoffkoordinierte Kupferkomplexe. Es werden Synthesewege zur Darstellung diskutiert und chemische, enzymatische und physikalische Eigenschaften mit denen des nativen Proteins verglichen.

1.3.2 Cu(I)-Thioneinmodelle

Da es bis jetzt noch nicht gelungen ist, von Cu(I)-Thionein Einkristalle zu züchten und somit die Struktur des Kupferbindungszentrums über eine Röntgenstrukturanalyse aufzuklären, muß der Umweg des Vergleichs mit einem möglichst genauen niedermolekularen Modell gewählt werden. Im Protein ist jedes Kupfer von vier aliphatischen Cysteinschwefeln umgeben. Die Anzahl der bis jetzt synthetisierten reinen Cu(I)-Thiolatkomplexe ist begrenzt. Das liegt zum Teil an der ausgeprägten Neigung von Cu(I) mit Mercaptiden unlösliche Polymere zu bilden. Aber die Tendenz von Cu(I) zur Clusterbildung ist ebenfalls unbestritten |29,46,47|. Mit 1.1- und 1.2-Dithiolatliganden entstehen bevorzugt Cu_8-Cluster |48,49|. Auch mit Monothiolatliganden sind einige mehrkernige Komplexe bekannt |5o-55|. Durch die Wahl geeigneter Reaktionsbedingungen, z.B. hoher Ligandüberschuß, kann die Kettenbildung unterdrückt werden. Die mehrkernigen Kupferthiolatkomplexe sind sauerstoffempfindlich und müssen unter Schutzgas dargestellt werden. Niedermolekulare aliphatische Mercaptane liefern bevorzugt polymere $[Cu(SR)]_n$-Ketten mit äquimolaren Cu:S-Verhältnis |55|. In diesen Verbindungen sind zwei Schwefel linear an das Kupfer koordiniert. Eine höhere Koordinationszahl und damit verbunden eine höhere Cu:S-Stöchiometrie wird mit aromatischen Mercaptanen erreicht |53,54,56|. In mesomeriefähigen Systemen kann Elektronendichte vom Metall abgeführt und über den gesamten Liganden verteilt werden. Diese elektronischen

Verhältnisse entsprechen aber nicht denen des nativen Proteins. Es soll versucht werden, mit einem aliphatischen Thiol einen Kupferkomplex mit einem Cu:S-Verhältnis größer eins zu synthetisieren.

2. EXPERIMENTELLES

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Boehringer, Mannheim	Xanthin
	Xanthinoxidase
Ega-Chemie, Steinheim	2- (2-Aminoethyl)-pyridin
	1.2-Bis-(mercaptomethyl)-4.5-dimethylbenzol
	1.4-Diaminobutan
	1.4-Diaminobutan Dihydrochlorid
	1.3-Diaminopropan
	Dibenzoylmethan
	Gelatine
	Imidazol-2-aldehyd
	Natriumborhydrid
	Pyridin-2-aldehyd
	Tetramethylammoniumchlorid
Merck, Darmstadt	$Cu(NO_3)_2 x 3H_2O$
	Cu-Pulver
	Ethanol
	Molsieb, 3Å
	Natriumtetraborat
	Triethylamin
Messer-Griesheim, Düsseldorf	2-Ring und 3-Ring Stickstoff
	Spezialargon
Serva. Heidelberg	4-Nitroblautetrazoliumchlorid
Sigma, Heidelberg	Histamin
	Rinderserumalbumin

Alle übrigen Chemikalien wurden in p.a. Qualität von Fa. Merck, Darmstadt bezogen. Das verwendete Wasser war entionisiert und quarzdestilliert. Es hatte eine Leitfähigkeit von weniger als 1µS. Cu_2Zn_2-Superoxiddismutase wurde isoliert aus Rindererythrozyten |57| und freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. A.Gärtner.

2.1.2 Geräte

Beckman, München	Infrarotspektrophotometer Acculab 4
	UV/vis-Spektralphotometer Model 25 mit Schreiber
	UV/vis-Spektralphotometer DU 4o
Bruker, Karlsruhe	Protonenresonanzspektrometer Bruker WP 8o
Cathodeon, Cambridge	Cu-Hohlkathodenlampe, λ = 324.7 nm
Hellma, Müllheim	Quarz- und Glasküvetten
Heraeus Christ, Osterode	Laborzentrifuge Junior 15oo
Honeywell,	53o xy-Recorder
Isotherm, Karlsruhe	Dewargefäße
JASCO, Tokio	J 2o A Spektralpolarimeter
Mettler Waagen, Gießen	Analysenwaage HL 52
	Laborwaage E 2ooo
Perkin-Elmer, Überlingen	Atomabsorptionsspektrometer 4oo S mit Graphitrohrküvette und Programmeinheit HGA 76 B C,H,N-Analyser
Radiometer, Kopenhagen	pH-Meter
Varian, Darmstadt	Elektronenspinresonanz-Spektrometer E 1o9 mit Temperiereinheit

Wenking,	Potentionstat LB 81 H Scanner VSG 72
Zeiss, Oberkochen	Flammenphotometer M 4o III mit Cu-Hohlkathodenlampe λ = 324.7 nm und Schreiber

2.2 Elementaranalysen

Kupfer wurde mit einem Perkin-Elmer Atomabsorptionsspektrometer 4oo S mit Graphitrohrküvette anhand von Eichlösungen bestimmt. Höhere Kupferkonzentrationen wurden so verdünnt, daß ihre Konzentration kleiner als 10^{-5}M war. Proteinhaltigen Lösungen wurde 10^{-4}M EDTA zugegeben.

C,H,N-Analysen wurden mit einem C,H,N-Analyzer der Firma Perkin-Elmer bestimmt.

Die Werte sind im Anschluß zur jeweiligen Arbeitsvorschrift aufgeführt.

2.3 Spektrometrie

2.3.1 Infrarotspektrometrie

Die Infrarotspektren wurden mit einem Beckman-Infrarot-Spektralphotometer Acculab 4 im Bereich von 4ooo-6oocm^{-1} aufgenommen. Die Proben wurden als KBr-Preßling eingesetzt.

2.3.2 Elektronenabsorption

Die Elektronenabsorptionsspektren der Komplexe wurden mit einem Beckman DU 4o Spectrophotometer aufgenommen. Es wurden Quarzküvetten von 1cm Schichtdicke verwendet.

2.3.3 EPR-Spektroskopie

Die Elektronenspinresonanz wurde mit einem Varian E 1o9 EPR-Spektrometer gemessen. Als Küvetten dienten Quarzröhrchen von 3 mm Durchmesser und einem Meßvolumen von 3oo µl. Die Kupferkonzentration war 1 mM. Lösungsmittel

war Methanol für Verbindungen I-III und eine 5%ige Propylenglykollösung für die Verbindungen IV bis VIII. Die g- und A-Werte wurden nach |58| berechnet. Folgende Aufnahmebedingungen wurden eingehalten: Temperatur 77K, Magnetfeld 2500-3500 G, Modulationsamplitude 10 G, Modulationsfrequenz 100 KHz, Mikrowellenleistung 20 mW, Mikrowellenfrequenz 9.24 GHz, Aufnahmezeit 4 min.

2.4 Cyclische Voltammetrie

Potentiostat LB 81 H und Scanner VSG 72 für die elektrochemischen Messungen waren von der Firma Wenking. Es wurde eine Drei-Elektrodenanordnung benutzt mit einer Glaskohle-Scheibenelektrode (Ø 2mm) als Arbeitselektrode, eine Pt-Bezugselektrode und zum Vergleich eine gesättigte Kalomelelektrode. Die Lage der Halbwellenpotentiale der Komplexe ließ es zu, in wäßriger Lösung in 80mM Kaliumchlorid zu arbeiten; Komplexkonzentration war 2.3mM. Alle Versuche wurden unter Stickstoff ausgeführt. Die Cyclen wurden im Bereich von -0.4V bis +0.6V mit den Vorschubgeschwindigkeiten 0.03, 0,05, 0,1 und 0.2 V/s mit einem Honeywell 530 xy Schreiber aufgezeichnet. (Tabelle 1). Die Glaskohleelektrode erzielte die besten Ergebnisse. Geringe Adsorptionserscheinungen an der Elektrode konnten vernachlässigt werden, da der Einfluß auf die Lage des Potentials innerhalb der Meßgenauigkeit lag |59|. Versuche, als Arbeitselektrode anderes Elektrodenmaterial wie Ag/Ag^+, Au/Au^+ oder Pt/Pt^+ einzusetzen, lieferte nur ungenau auswertbare, breite und flache Voltammogramme.

Tabelle 1 : Redoxcyclen der Komplexe IV-VI bei verschiedenen Vorschubgeschwindigkeiten.
Elektrolyt: 8o mM KCl, Lösungsmittel: H_2O, Konzentration der Komplexe: 2.3 mM

Gemersen gegen SCE		Vorschub [V/s]				
		o.2	o.1	o.o5	o.3	
IV $CuL_{1.4py}(ClO_4)_2 \times 1/2H_2O$,	E_{pc} [V]	-o.19o	-o.183	-o.2o5	-o.163	
	E_{pa}	+o.122	+o.1o5	+o.13o	+o.o78	
	$\lvert E_{pc}-E_{pa}\rvert$	o.312	o.288	o.335	o.241	
	$E_{1/2}$	-o.o34	-o.o39	-o.o38	-o.o42	$E_{1/2}$=-o.o38V
V $CuL_{1.3py}(ClO_4)_2$	E_{pc}	-o.32o	-o.31o	-o.29o	-o.3oo	
	E_{pa}	-o.115	-o.145	-o.175	-o.145	
	$\lvert E_{pc}-E_{pa}\rvert$	o.2o5	o.165	o.115	o.155	
	$E_{1/2}$	-o.218	-o.228	-o.233	-o.223	$E_{1/2}$=-o.23o V
VI $CuL_{NHpy}(ClO_4)_2 \times 1/2H_2O$	E_{pc}	-o.46o	-o.45o	-o.45o	-o.45o	
	E_{pa}	-o.37o	-o.375	-o.385	-o.385	
	$\lvert E_{pc}-E_{pa}\rvert$	o.o9o	o.o75	o.o65	o.o65	
	$E_{1/2}$	-o.415	-o.413	-o.418	-o.418	$E_{1/2}$=-o.416V

E_{pc} = Kathodenpotential, E_{pa} = Anodenpotential, $E_{1/2}$ = Halbwellenpotential

2.5 Stabilitätskonstanten

Die CD-Spektren zur spektroskopischen Ermittlung der Stabilitätskonstanten der Kupferkomplexe wurden mit einem JASCO J 2o A Spektropolarimeter aufgenommen. Es wurden Quarzküvetten von 1cm Schichtdicke verwendet.

Zuerst wurde eine Eichkurve von $Cu(ClO_4)_2$ mit Serumalbumin aufgestellt. Kupfer wurde im Unterschuß gegenüber Serumalbumin zugegeben, so daß jeweils das gesamte Kupfer komplexgebunden vorlag und somit die Absorption des CD-Übergangs bei 55o nm proportional zu Gesamtkupferkonzentration war.

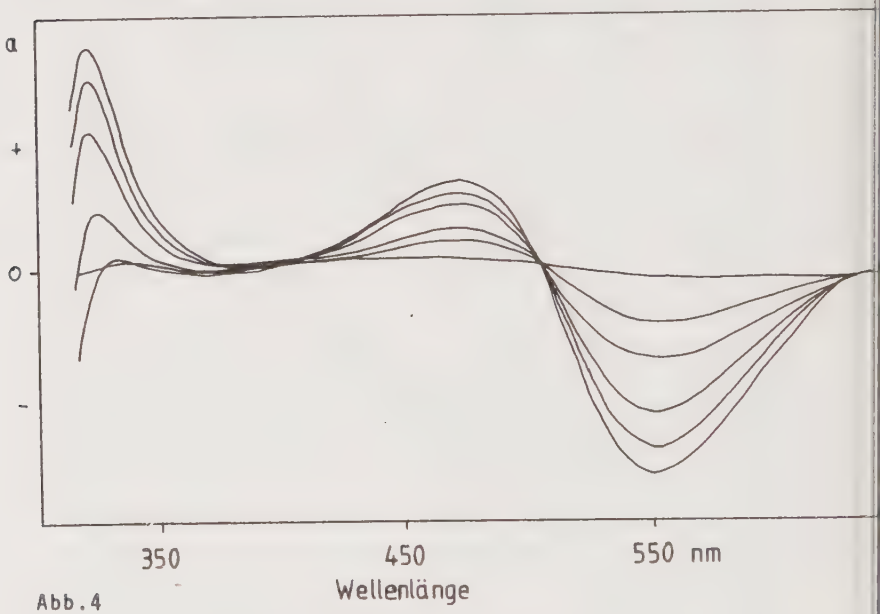


Abb.4

CD-Spektren von CuBSA

C_{BSA}= 6 x $1o^{-4}$M, C_{Cu}= 1.28 x $1o^{-4}$, 2.5 x $1o^{-4}$, 3.72 x $1o^{-4}$, 4.95 x $1o^{-4}$M, 6.1 x $1o^{-4}$

Tabelle 2: Eichkurve von $Cu(ClO_4)_2$ mit Serumalbumin (6×10^{-4}M) Amplitude der Absorption bei 550 nm

[Cu]	a_{550} [mm]
1.24×10^{-4}	22
2.5×10^{-4}	39
3.72×10^{-4}	56
4.95×10^{-4}	71
6.1×10^{-4}	79

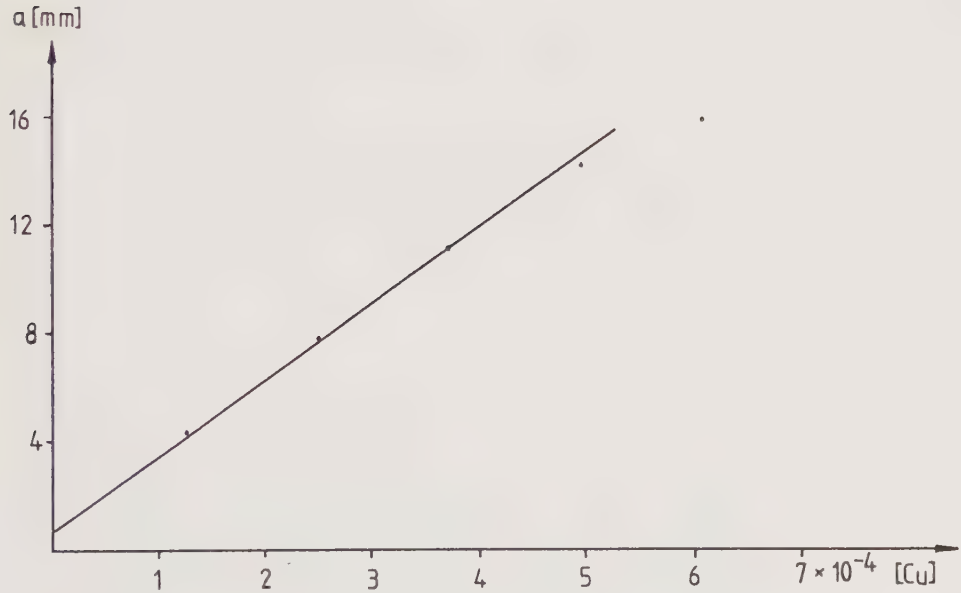


Abb.5
Eichkurve von $Cu(ClO_4)_2$ mit Serumalbumin (6×10^{-4}M)

Es wird eine Serie von Lösungen angesetzt, die eine konstante Konzentration an Serumalbumin (BSA_{tot}) im Überschuß und verschiedene Konzentrationen des Kupferkomplexes (Cu_{tot}) enthalten. Langsam wird sich ein thermodynamisches Gleichgewicht β_{rel} einstellen, entsprechend der Bildungskonstanten von Kupferserumalbumin K_{CuBSA} und Kupferkomplex K_{CuL} (Gleichungen 4-7)

$$CuL \rightleftharpoons Cu + L \qquad (4)$$

$$Cu + BSA \rightleftharpoons CuBSA \qquad (5)$$

$$CuL + BSA \rightleftharpoons CuBSA \qquad (6)$$

$$\beta_{rel} = \frac{K_{CuBSA}}{K_{CuL}} = \frac{[CuBSA]\,[L]}{[BSA][CuL]} \qquad (7)$$

Nach der Gleichgewichtseinstellung wird die Extinktion bei 55o nm im CD-Spektrum gemessen. Bei dieser Wellenlänge absorbiert allein der Kupferserumalbuminkomplex Aus der Eichkurve kann der dazugehörige Wert der Konzentration an Kupferserumalbumin entnommen werden. Dieser Wert entspricht der Gleichgewichtskonzentration [CuBSA]. Danach lassen sich die anderen Glieder aus Gleichung (7) wie folgt bestimmen:

$$[L] = CuBSA$$

$$[CuL] = Cu_{tot} - [CuBSA]$$

$$[BSA]\ BSA_{tot} - [CuBSA]$$

Meßreihen zur Bestimmung der relativen Stabilitätskonstanten:

$CuL_{1.4py}(ClO_4)_2 \times 1/2H_2O$ IV,

$BSA_{tot} = 6 \times 10^{-4}$, 20 mM HEPES, pH 7.4

Cu_{tot}	a [mm]	[CuBSA]≙[L]	[CuL]	[BSA]	β
2.62×10^{-4}	30.5	1.9×10^{-4}	7.2×10^{-5}	4.1×10^{-4}	1.22
3.93×10^{-4}	39	2.52×10^{-4}	1.41×10^{-4}	3.48×10^{-4}	1.29
5.24×10^{-4}	42	2.8×10^{-4}	2.44×10^{-4}	3.2×10^{-4}	1.00
				Ø	1.17

$CuL_{1.3py}(ClO_4)_2$ V

$BSA_{tot} = 6 \times 10^{-4}$ M, 20 mM HEPES, pH 7.4

Cu_{tot}	a [mm]	[CuBSA]≙[L]	[CuL]	[BSA]	β
2.44×10^{-4}	18	1×10^{-4}	1.44×10^{-4}	5×10^{-4}	0.14
3.66×10^{-4}	23.5	1.4×10^{-4}	2.26×10^{-4}	4.6×10^{-4}	0.19
4.88×10^{-4}	30	1.87×10^{-4}	3.01×10^{-4}	4.13×10^{-4}	0.28
				Ø	0.20

$CuL_{NHpy}(ClO_4)_2 \times 1/2H_2O$ VI

$BSA_{tot} = 6 \times 10^{-4}$ M, 20 mM HEPES, pH 7.4

Cu_{tot}	a [mm]	[CuBSA]≙[L]	[CuL]	[BSA]	β
1.2×10^{-4}	14	4.5×10^{-5}	7.5×10^{-5}	5.55×10^{-4}	0.049
2.4×10^{-4}	19	6.2×10^{-5}	1.7×10^{-4}	5.38×10^{-4}	0.042
4.8×10^{-4}	29	9.6×10^{-5}	3.84×10^{-4}	5.04×10^{-4}	0.048
6.0×10^{-4}	34	1.08×10^{-4}	4.92×10^{-4}	4.92×10^{-4}	0.048
				Ø	0.047

$CuL_{1.3im}(ClO_4)_2 \times 1.5H_2O$ VII

BSA_{tot} = 6 x $1o^{-4}$ M, 2o mM HEPES, pH 7.4

Cu_{tot}	a [mm]	[CuBSA]≅[L]	[CuL]	[BSA]	β
$2.4x1o^{-4}$	15	$9.6x1o^{-5}$	$1.44x1o^{-4}$	$5.o4x1o^{-4}$	o.13
3.6	18.5	$1.18x1o^{-4}$	$2.42x1o^{-4}$	$4.82x1o^{-4}$	o.12
4.8	21	$1.35x1o^{-4}$	$3.45x1o^{-4}$	$4.65x1o^{-4}$	o.11
6.o	24	$1.5x1o^{-4}$	$4.5x1o^{-4}$	$4.5x1o^{-4}$	o.11
				Ø	o.12

$CuL_{1.4im}(ClO_4)_2 \times 1/2H_2O$ VIII

BSA_{tot} 6 x $1o^{-4}$ M, 2o mM HEPES, pH 7.4

Cu_{tot}	a [mm]	[CuBSA]≅[L]	[CuL]	[BSA]	β
$2.4x1o^{-4}$	24.5	$1.5x1o^{-4}$	$9x1o^{-5}$	$4.5x1o^{-4}$	o.55
$3.6x1o^{-4}$	31.5	$1.95x1o^{-4}$	$1.65x1o^{-4}$	$4.o5x1o^{-4}$	o.57
$4.8x1o^{-4}$	34.5	$2.19x1o^{-4}$	$2.61x1o^{-4}$	$3.81x1o^{-4}$	o.48
$6.ox1o^{-4}$	36	$2.32x1o^{-4}$	$3.68x1o^{-4}$	$3.68x1o^{-4}$	o.4o
				Ø	o.5o

2.6 Superoxiddismutaseaktivität

Zur Bestimmung der Enzymaktivität wurde der NBT-Test |69| benutzt. In diesem Test wird Xanthin/Xanthinoxidare als superoxidgenerierendes System eingesetzt. Bei der Oxidation von Xanthin zu Harnsäure durch die Monooxygenase Xanthinoxidase wird neben Wasserstoffperoxid auch Superoxid gebildet. SOD-aktive Substanzen konkurrieren mit NBT um Superoxid und verringern so die Formazanausbeute. Es wird eine bestimmte Menge Xanthin zugesetzt und die Reaktion spektroskopisch verfolgt. Ist das Substrat vollständig verbraucht, steigt A_{540} nicht weiter an. Bei gleichen Bedingungen wird dieselbe Superoxid- und damit Formazanmenge produziert und somit wird eine verringerte Formazanbildung auf eine konkurrierende Entfernung von Superoxid zurückgeführt.

o.2 ml des Reaktionsvolumens enthielten o.62 mM Nitroblautetrazolium, 2o mM HEPES-Puffer pH 7.4, o.2% (w/v) Gelatine, 5o µM Xanthin, o.18 µM Xanthinoxidase und Kupferkomplex oder Superoxiddismutase in verschiedenen Konzentrationen.

2.7 Arbeitsvorschriften

2.7.1 Cu_2Zn_2-Superoxiddismutasemodelle

2.7.1.1 (3-(2-Pyridylethylimino)[(1.3-diphenyl)prop-1-enonato]-N,N',O)) Kupfer(II), Perchlorat oder $CuL_{py}ClO_4\ H_2O$, I

Zu einer Lösung von 48o µl (em Mol) 2-(Aminoethyl)pyridin und 75o mg (2m Mol) Dibenzoylmethan langsam zutropfen. Anschließend wird noch 1 Stunde unter Rückfluß gekocht. Beim Abkühlen fallen dunkelgrüne Kristalle aus, die abfiltriert, mit Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet werden.

Ausbeute: 73o mg ≙ 71.9 %

Elementaranalyse: $C_{22}H_{19}Cl\ N_2\ O_6\ Cu\ H_2O$ (5o8.44)

ber: C:51.96 H:4.16 N:5.51 Cu:12.5o

gef: c:51.53 H:4.15 N:5.49 Cu:12.87

2.7.1.2 (3-(2-Pyridylethylimino)[(1.3-diphenyl)(prop-1-enonato]-(N,N'O))Kupfer(II), Nitrat oder $CuL_{py}NO_3 \times H_2O$, II

Zu 5oo µl (4mMol) Aminoethylpyridin und 48o mg (2mMol) $Cu(NO_3)_2 \times 6H_2O$ in 15 ml MeOH wird langsam 448 mg (2mMol) Dibenzoylmethan in 15 ml MeOH bei Raumtemperatur zugetropft und anschließend noch 1 Stunde gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum abgezogen und das zurückbleibende grüne Öl mit 1o ml CH_2Cl_2 aufgenommen. Es wird mit Ether versetzt bis zur ganz leichten Trübung. Im Gefrierschrank bilden sich nach 2 Stunden dunkelgrüne blockartige Kristalle, die abfiltriert werden, mit wenig sehr kaltem Methylenchlorid gewaschen und an der Luft getrocknet werden.
Unkristalisiert wird aus MeOH|Ether.
Ausbeute: 685 mg ≙72.7 %
Elementaranalyse: $C_{22}\ H_{19}\ N_3\ O_5\ Cu \times H_2O$ (47o.95)
ber: C:56.1o H:4.49 N:8.92 Cu:13.49
gef: C:55.91 H:4.37 N:8.96 Cu:13.87

2.7.1.3 (3-(4-Imidazolylethylimino)[(1.3-diphenyl)prop-1-enotato]-(N,N',O))Kupfer(II), Perchlorat oder $CuL_{hm}ClO_4 \times H_2O$, III

736 mg (4mMol) Histamin Dihydrochlorid und 74o mg (2mMol)$Cu\ (ClO_4)_2 \times 6\ H_2O$ werden in einer Mischung aus 1o ml H_2O und 5o ml MeOH gelöst. Mit Natriumcarbonat wird die Lösung auf pH 9 gestellt. Dazu werden langsam 448 mg (2mMol) Dibenzoylmethan in 15 ml MeOH zugetropft und die Reaktionslösung wird 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Im Gefrierschrank bilden sich nach drei bis fünf Tagen schwarzgrüne Kristalle. Das Produkt wird abfiltriert, mit MeOH gewaschen, an der Luft getrocknet und umkristallisiert aus wenig $MeOH/H_2O$
Ausbeute: 458 mg ≙ 46.o %
Elementaranalyse: $C_{2o}\ H_{18}\ Cl\ N_3\ O_4\ Cu \times H_2O$ (497.43)
ber: C:48.29 H:4.o5 N:8.45
gef: C:48.o4 H:3.99 N:8.59

2.7.1.4 ([1.8-Di(2-pyridyl)-2.7-diazaoctadien-1.7]-(N,N',N",N"')),Kupfer(II), Diperchlorat oder $CuL_{1.4py}(ClO_4)_2 \times 1/2\ H_2O$, IV

Zu einer Lösung von 38o µl (4mMol) Pyridin-2-aldehyd und 74o mg (2mMol) $Cu(ClO_4)_2 \times 6H_2O$ lo ml Wasser werden langsam 188 mg (2mMol) Putrescin in 2ml Wasser zugetropft. Nach wenigen Minuten setzen sich aus der grünen Reaktionsmischung kleine türkisblaue Nadeln ab. Die Kristalle werden abfiltriert, mit Wasser und anschließend mit Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet.
Ausbeute: 7o5 mg = 65.5 %
Elementaranalyse: $C_{16}H_{18}Cl_2N_4O_8Cu \times 1/2H_2O$ (537.9)
ber: C:35.73 H:3.56 N:1o.42 Cu:11.81
gef: C:35.5o H:3.43 N:1o.39 Cu:11.45

2.7.1.5 ([1.7-Di(2-pyridyl)-2.6-diazaheptadien-1.6]-(N,N',N",N"')),Kupfer(II), Diperchlorat oder $CuL_{1.3py}(ClO_4)_2$, V

Diese Verbindung wurde nach einer modifizierten Vorschrift von Goodwin und Lions |35| dargestellt. 74o mg (2mMol) $Cu(ClO)_2 \times 6H_2O$ werden in lo ml Methanol/Acetonitril (1:1) gelöst. Danach werden 38o µl (4mMol) Pyridin-2-aldehyd und 17o µl (2mMol) 1.3-Diaminopropan zugegeben. Die Reaktionslösung wird auf die Hälfte eingeengt und in den Kühlschrank gestellt. Innerhalb einiger Tage wachsen dunkelblaue rautenförmige Kristalle, die abfiltriert, mit Methanol gewaschen und an der Luft getrocknet werden.
Ausbeute: 69o m ≙ 67.o %
Elementaranalyse: $C_{15}H_{16}Cl_2N_4O_8Cu$ (514.73)
ber: C:34.99 H:3.11 N:1o.89 Cu:11.62
gef: C:34.97 H:3.2o N:11.16 Cu:11.43

2.7.1.6 ([1.8-Bis(2-pyridyl)-2.7-diazaoctan]-(N,N',N",N"'))Kupfer(II), Diperchlorat oder $CuL_{NHpy}(ClO_4)_2 \times 1/2H_2O$, VI

25o mg (o.46mM) IV und 9oo mg Borax in 3o ml H_2O lösen und unter Rühren 88o mg Natriumborhydrid zugeben. Es fällt sofort ein brauner amorpher Niederschlag von elementarem Kupfer aus, der abfiltriert wird. Wenn das Natriumborhydrid abreagiert hat (Ende der Gasentwicklung) werden 17o mg (o.45mM) $Cu(ClO_4)_2$ $6H_2O$ zugegeben. Nach ca. einer Woche bilden sich im Kühlschrank wenige intensiv blaue Kristalle, die abfiltriert und an der Luft getrocknet werden. Nach dem Einengen der Mutterlauge fallen neben dem Kupferkomplex beträchtliche Mengen von Borax mit aus.

Ausbeute: 7o mg ≙ 28.1 %

Elementaranalyse: $C_{16}H_{22}Cl_2N_4O_8Cu$ $1/2H_2O$ (541.74)
ber: C:35.47 H:4.25 N:1o.34 Cu:11.73
gef: C.35.42 H:4.18 N:1o.19 Cu:11.52

2.7.1.7 ([1.8-Di(2-imidazolyl)-2.7-diazaoctadien-1.7]-(N,N',N",N'"),Kupfer(II), Diperchlorat oder $CuL_{1.4im}(ClO_4)_2 \times 1/2H_2O$, VII

39o mg (1.15 mM) $Cu(ClO_4)_2 \times 6H_2O$ im 15 ml Ethanol/Wasser (2:1) lösen und 22o mg (2.3 mM) Imidazol-2-aldehyd portionsweise zugeben und anschließend 185 mg (1.15 mM) 1.4-Diaminobutan Dihydrochlorid.

Bei Raumtemperatur rühren bis sich alles gelöst hat. Die Reaktionslösung besitzt pH 4. Innerhalb einiger Tage Stehen im Kühlschrank bildet sich ein grüner mikrokristalliner Niederschlag. Dieser wird abfiltriert, mit wenig kaltem Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet.

Ausbeute: 121 mg ≙ 23.4 %

Elementaranalyse: $C_{12}H_{16}Cl_2N_6O_8Cu \times 1/2H_2O$ (515.72)
ber: C:27.94 H:3.3o N:16.3o Cu:12.32
gef: C:27.88 H:3.68 N:16.o1 Cu:12.86

2.7.1.8 ([1.7-Di(2-imidazolyl)-2.6-diazaheptadien-1.6]-(N,N',N",N"')),Kupfer(II), Diperchlorat oder $CuL_{1.3im}(ClO_4)_2 \times 1.5H_2O$, VIII

34o mg (1mMol) $Cu(ClO_4)_2 \times 6H_2O$ in 1o ml Methanol/Wasser (1:1) lösen und portionsweise insgesamt 192 mg (2mMol) Imidazol-2-aldehyd zugeben und bei Raumtemperatur rühren bis sich alles gelöst hat. 85 µl (1mMol) 1.3-Diaminpropan zugeben und mit $HClO_4$ auf pH 4 stellen. Nach einigen Tagen im Kühlschrank kristallisieren langsam türkisblaue Nadeln aus. Niederschlag abfiltrieren und bei Raumtemperatur an der Luft trocknen.

Ausbeute: 1o5 mg ≙ 2o.2 %

Elementaranalyse: $C_{11}H_{17}Cl_2N_6O_{9.5}Cu$ $1.5H_2O$ (519.71)

ber: C:25.42 H:3.27 N:16.17 Cu:12.22

gef: C:25.89 H:3.17 N:15.67 Cu:12.73

2.7.2 Cu(I)-Thioneinmodelle

Alle Arbeiten wurden unter Stickstoff durchgeführt. Die Lösungsmittel waren getrocknet und N_2-gesättigt. Ethanol wurde über Molekularsieb (3Å) aufbewahrt.

2.7.2.1 Tetraacetonitrilokupfer(I)nitrat, $[Cu(CH_3CN)_4]NO_3$

48.3 g (o.2 Mol) $Cu(NO_3)_2 \times 3H_2O$ und 12.7 g (o.2 Mol) Kupferpulver werden in 12o ml Acetonitril unter Stickstoffatmosphäre so lange unter Rückfluß gekocht, bis eine nahezu farblose Lösung entstanden ist. Die Reaktionsmischung wird von ungelösten Resten abfiltriert, im Gefrierschrank bei -18°C bilden sich innerhalb 12 Stunden farblose Kristalle, die abfiltriert, im Stickstoffstrom getrocknet und unter Stickstoff aufbewahrt werden.

Elementaranalyse: $C_8H_{12}N_5O_3Cu$ - 289.67

ber: C:33.17 H:4.14 N:24.18

gef: C:33.o1 H:4.25 N:24.12

2.7.2.2 $(Me_4N)_2[Cu_4(C_8H_8\text{-}(CH_2S)_2)_3]$

Zu einer Lösung von 1.o g (5.o4 mMol) 1.2-Bis-(mercaptomethyl)-4.5-dimethylbenzol 1.o2 g (1o.1 mMol) Triethylamin und o.44 g (4 mMol) Tetramethylammoniumchlorid in 8o ml Ethanol/Acetonitril (1:1) wird bei Raumtemperatur unter kräftigem Rühren eine Lösung von o.58 g (2 mMol) $[Cu(MeCN)_4]NO_3$ in 1o ml Acetonitril innerhalb von 3o Minuten zugetropft. Nach mehreren Tagen Stehen im Kühlschrank bei -4°C bilden sich farblose, durchsichtige Kristalle.

Elementaranalyse: $C_{38}H_{6o}N_2S_6Cu_4$ - 99o.92

ber: C:46.o6 H:6.o5 N:2.83 Cu:25.64

gef: C:46.11 H:6.21 N:2.81 Cu:26.o1

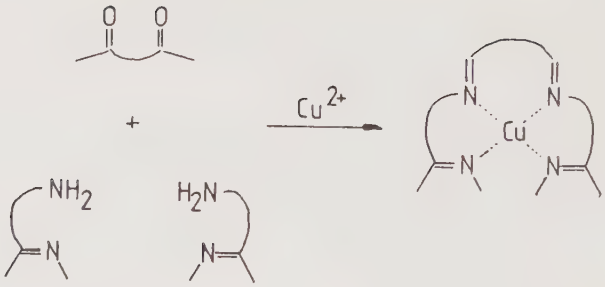
3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1 Zur gezielten Synthese von Superoxiddismutase-modellen

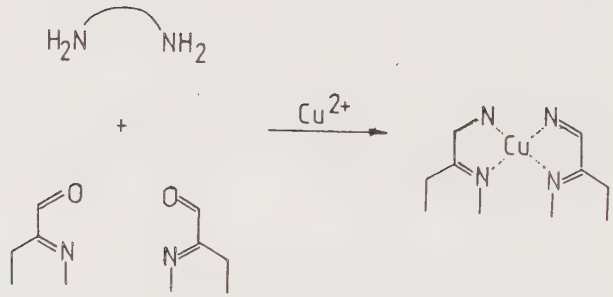
Der Komplex soll in beiden Oxidationsstufen +I und +II in wässriger Lösung stabil sein und Cu^+ vor Disproportionierung schützen. Dies wird zum einen erreicht durch die Art der koordinierten Atome. Gesättigter Aminstickstoff komplexiert vor allem Cu^{2+} und destabilisiert Cu^+. Ungesättigte Stickstoffatome, wie sie beispielsweise in Imidazol, Pyridin oder Azomethinen vorliegen, liefern mit beiden Oxidationsstufen hinreichend beständige Verbindungen. Außerdem soll die Dissoziation in Ligand und Metall vernachlässigbar klein sein. Ein vierzähniger statt mehreren einzähnigen Liganden bringt durch die Entropiezunahme einen Stabilitätsgewinn. Ebenso auf die Stabilität wirkt die Ausbildung von fünf- und sechsgliedrigen Chelatringen zwischen Zentralion und Ligand. Das Gerüst muß aber trotzdem noch flexibel genug sein, um die geometrische Änderung der koordinierenden Atome beim Redoxwechsel weitgehend spannungsfrei zu ermöglichen.

Als Liganden, die diese Bedingungen erfüllen,bieten sich Di-Schiffbasen an. Wie in Schema 1 skizziert, lassen sie sich darstellen aus einer Dicarbonylverbindung (Aldehyd oder Keton) und primären Aminen oder nach Schema 2 durch Kondensation eines aromatischen N-heterocyclischen Aldehydes mit einem aliphatischen Diamin.

Schema 1:

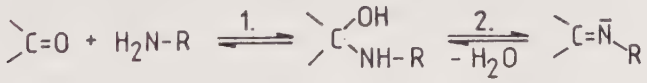


Schema 2:



3.1.1 Reaktion einer Dicarbonylverbindung mit einem primären Amin

Gemäß Schema 1 soll eine Dicarbonylverbindung sich umsetzen mit einem primären Amin zu einem vierzähnigen Ligand mit einem Donorset von vier ungesättigten Stickstoffatomen. Das Amin ist an einen stickstoffhaltigen aromatischen Heterocyclus gebunden. Zusätzlich muß ein Aromat im Molekül so eingeführt sein, daß er in Konjugation zur gebildeten Azomethingruppe steht, da isolierte C=N-Doppelbindungen leicht hydrolisieren. Als Dicarbonylkomponente diente dabei Dibenzoylmethan und als geeignete Amine wurden Histamin oder 2-(2-Aminoethyl)pyridin eingesetzt. Die Schiffbasebildung verläuft über zwei Stufen. Mit starken Nukleophilen, wie primäre Amine, erfolgt die Reaktion auch ohne Zusatz von Säuren. Im ersten Schritt greift das Amin mit seinem freien Elektronenpaar den positivierten Carbonylkohlenstoff nucleophil an und es entsteht ein Carbinolamin als Zwischenstoff, das in der Regel sofort im zweiten Reaktionsschritt zum Azomethin dehydratisiert |61|.



3.1.1.1 Reaktion ohne Templat

Zunächst wurde nun versucht, die Lage des Gleichgewichts der Wasserabspaltung durch ein wasserentziehendes Mittel günstig zu verschieben. Die Umsetzung wurde in getrockneter methanolischer Lösung in Gegenwart von Molsieb zum Binden des Reaktionswassers durchgeführt. Nach einem Tag Stehenlassen bei Raumtemperatur oder nach einer Stunde kochen unter Rückfluß fällt als Hauptprodukt ein roter, amorpher Niederschlag aus. Mit Hilfe von Elementaranalyse, Schmelzpunkt |60| und ^{1}H-NMR (Tabelle 3, Abb.6)

konnte diese Verbindung als 3-Phenylindenon-(1) identifiziert werden. Das bedeutet, daß unter diesen Bedingungen nicht, wie gewünscht, das Diketon mit dem Amin reagiert, sondern bevorzugt eine intramolekulare Hydroxymethylierung mit spontaner Dehydratisierung der Ketogruppe mit dem Aromaten eintritt.

Tabelle 3

Chemische Verschiebungen des Protonresonanzspetrums von 3-Phenylindenon-(1).
Lösungsmittel: $CDCl_3$

N°	ppm	Integration
1	8.o4	
2	8.o1	4
3	7.97	
4	7.41	5*
5	7.42	$CHCl_3$
6	6.93	1

* Integration etwas zu hoher Wert, da der Peak der Phenylprotonen von Lösungsmittelpeak teilweise überlagert ist.

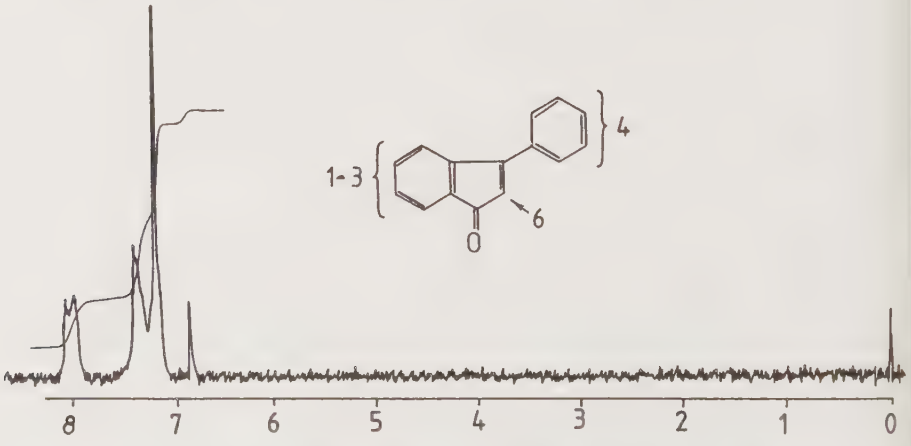
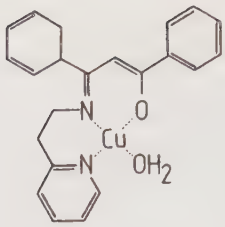


Abb.6: ^{1}H-NMR-Spektrum von 3-Phenylindenon-(1) mit Zuordnung der Peaks.

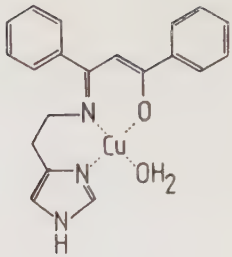
3.1.1.2 Reaktion als Templat

Die Rolle der Säurekatalyse kann aber auch ein Metall übernehmen. Da sich die Reaktivität der einzelnen Komponenten durch Koordination an ein Metall beeinflussen läßt, kann die Reaktion dadurch in eine bestimmte Richtung gelenkt werden. Man spricht dann von einem Templateffekt |62,63|. Diese Methode wurde vor allem schon erfolgreich angewandt zur Synthese macrocyclischer Liganden |64-68| und dabei erwies sich auch Cu(II) als effektives Templatmetall |67,68|. Das Reaktionsprodukt wird meistens als Metallkomplex isoliert.

Im Reaktionsgemisch stellt sich ein thermodynamisches Gleichgewicht ein der verschiedenen 1:1- und 2:1-Kupferkomplexe entsprechend ihrer Komplexbildungskonstanten. Die Koordination des Amins an das Metall setzt die Nukleophilie stark herab. Es wird aber noch genügend freies Amin in der Lösung vorhanden sein, um mit dem komplexierten Diketon zu reagieren. Durch die sterische Fixierung der Konformation der Ketoverbindung am Kupfer wird die intramolekulare Kondensation unterdrückt. Ebenso wird auf diese Art der Bildung von cis-/trans-Isomeren an der entstehenden C=N-Doppelbindung vorgebeugt. Möglicherweise aber ist die Carbonylaktivität herabgesetzt. Einerseits zwar wirkt das Kupfer als Kationensäure polarisierend auf den Carbonylsauerstoff und erhöht somit die positive Partialladung am C-Atom. Jedoch wird andererseits das konjugierte π-Elektronensystem über die Chelatbildung noch erweitert und die Abgabe eines Protons und Übergang zur Enolatform begünstigt. Die negative Ladung des Enolats wird über das gesamte π-Elektronensystem verteilt. Dadurch ist die Reaktionsfähigkeit gegenüber nucleophilen Reagenzien vermindert. Tatsächlich setzte sich nur eine der beiden Carbonylgruppen mit dem Amin um. Es konnten nur die Mono-Schiffbasen I, II und III isoliert werden (Abb.7 und 8). Auch wenn das Amin in großem Überschuß eingesetzt war, reagierte nur eine C=O-Gruppe.



ClO_4 oder NO_3



ClO_4

Abb.7a: I, $CuL_{py}(ClO_4) \times H_2O$
II, $CuL_{py}(NO_3) \times H_2O$

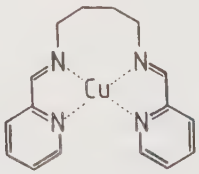
Abb.7b: III, $CuL_{hm}(ClO_4) \times H_2O$

3.1.2 Reaktion einer Carbonylverbindung mit einem aliphatischen, primären Diamin.

Die Synthesemöglichkeit nach Schema 2 als Templatreaktion war erfolgreich. Es konnten mehrere Komplexe auf diese Art isoliert werden. Im Gegensatz zu den drei ersten Verbindungen I-III sind die folgenden Komplexe auch wesentlich besser wasserlöslich - bis zu einer Konzentration von 3 mmol - und somit ohne Aufwand in biochemischen Tests einzusetzen.

3.1.2.1 $CuL_{1.4py}(ClO_4)_2 \times 1/2H_2O$, IV

1.4-Diaminobutan wurde kondensiert mit 2-Pyridinaldehyd in Gegenwart von Kupferperchlorat (Verbindung IV, Abb.8). Die wäßrige Lösung wurde auf pH 9 eingestellt. Dieser pH-Wert entspricht ungefähr dem pK-Wert des primären Amins. In diesem Bereich ist die Konzentration an freiem Amin noch ausreichend hoch und die Dehydratisierung schon hinreichend beschleunigt.



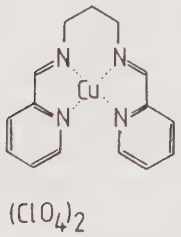
$(ClO_4)_2 \times 1/2\ H_2O$

Abb.8 IV, $CuL_{1.4py}(ClO_4)_2 \times 1/2H_2O$

Die Stickstoffe der zwei Azomethingruppen sind über eine Tetramethylenbrücke untereinander verbunden. Sie erlaubt den Wechsel von quadratisch planarer zu tetraedrischer Koordination der Donoratome.

3.1.2.2 $CuL_{1.3py}(ClO_4)_2$, V

Um etwas über die Bedeutung dieser sterischen Beweglichkeit auf die spektroskopischen und enzymatischen Eigenschaften zu erfahren, wurde die homologe Verbindung V (Abb.9) synthetisiert, die im Vergleich zu IV eine Methylengruppe weniger besitzt. Das Metall wird starr in quadratisch planarer Umgebung festgehalten.

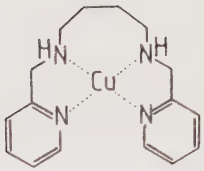


$(ClO_4)_2$

Abb.9: V, $CuL_{1.3py}(ClO_4)_2$

3.1.2.3 $CuL_{NHpy}(ClO_4)_2$, VI

Welchen Einfluß haben die elektronischen Verhältnisse des Donorsets auf die Reaktivität des Komplexes? In Verbindung VI (Abb.1o) wurden ausgehend von IV die beiden Azomethingruppen mit Natriumborhydrid zu sec. Aminogruppen reduziert. Das Reduktionsmittel wird dabei im Überschuß zugegeben, da unter dieser Bedingung auch das Cu^{2+} zu elementarem Cu° reduziert. Wenn das Borhydrid abreagiert hat, und der braune Niederschlag von Cu° abfiltriert ist, kann erneut $Cu(ClO_4)_2$ zugegeben werden. Der neue Komplex VI kristallisiert dann langsam

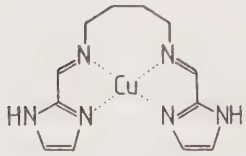


$(ClO_4)_2$ $\times 1/2\ H_2O$

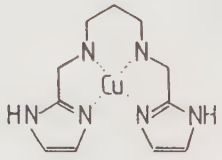
Abb.1o: $CuL_{NHpy}(ClO_4)_2 \times 1/2H_2O$ VI

3.1.2.4 $CuL_{1.4im}(ClO_4)_2 \times 1/2H_2O$ VII
und $CuL_{1.3im}(ClO_4)_2 \times 1.5H_2O$ VIII

In der Cu_2Zn_2-Superoxiddismutase ist Kupfer von vier Imidazolen umgeben. Im Vergleich zu Pyridin ist Imidazol ein besserer π-Acceptor |71|. Diese Eigenschaft ist vor allem wichtig zur Komplexierung von Cu(I). VII und VIII (Abb.11a und 11b) wurden erhalten aus Imidazol-2-aldehyd und dem entsprechenden Diamin. Der Aldehyd ist in Wasser und den meisten organischen Lösungsmitteln weitgehend unlöslich, löst sich aber in Gegenwart von Cu(II)-Salzen langsam auf. Der komplexierte Aldehyd reagiert mit dem Diamin zur Di-Schiffbase.



$(ClO_4)_2$ $\times 1/2\ H_2O$



$(ClO_4)_2$ $\times 1.5\ H_2O$

Abb.11a:
$CuL_{1.4im}(ClO_4)_2 \times 1/2H_2O$, VII

Abb.11b:
$CuL_{1.3im}(ClO_4)_2 \times 1.5H_2O$, VII

Der N-3-Imidazolstickstoff ist mit seinem freien Elektronenpaar am Metall koordiniert. Das freie Elektronenpaar des N-1-Stickstoffs ist des aromatischen π-Elektronensextetts. Protonierung oder Metallbindung würde die Aromatizität herabsetzen und ist daher energetisch ungünstig und unwahrscheinlich.

3.1.3 Infrarotspektroskopie

Die Azomethinbildung wurde anhand der Valenzschwingung der C=N-Doppelbindung verfolgt. Eine Zuordnung der Hauptbanden der Kupferkomplexe I-VIII ist Tabelle 4 zu entnehmen. Die IR-Spektren sind in Abb.12-19 wiedergegeben.

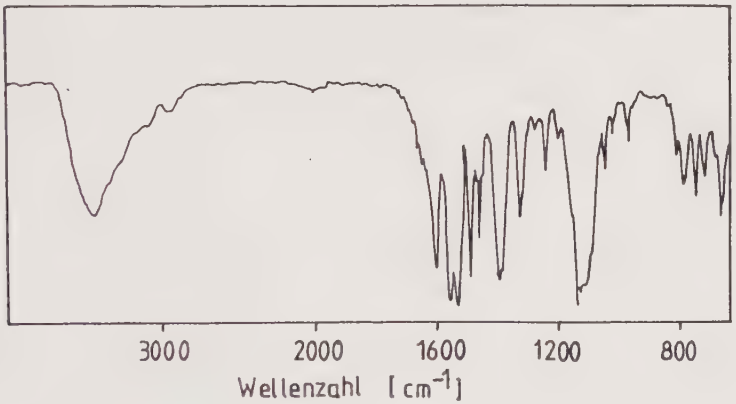


Abb.12: IR-Spektrum von $CuL_{py}ClO_4 \times H_2O$, I

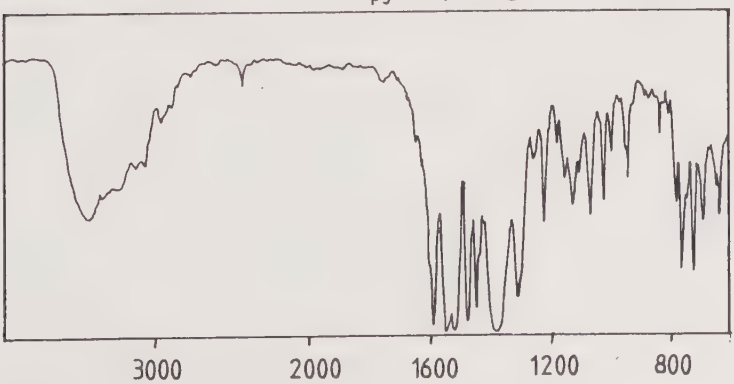


Abb.13: IR-Spektrum von $CuL_{py}NO_3 \times H_2O$, II

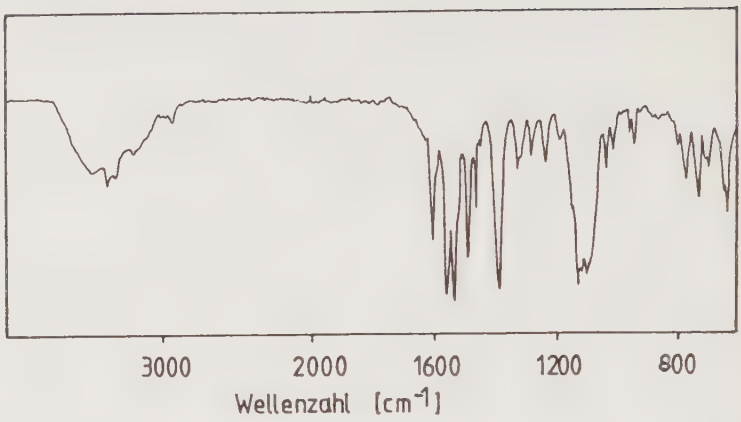


Abb.14: IR-Spektrum von $CuL_{hm}ClO_4 \times H_2O$, III

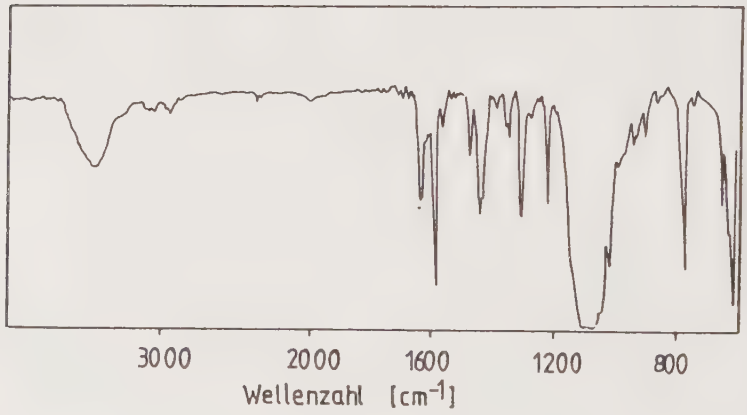


Abb.15: IR-Spektrum von $CuL_{1.4py}(ClO_4)_2 \times 1/2H_2O$, IV

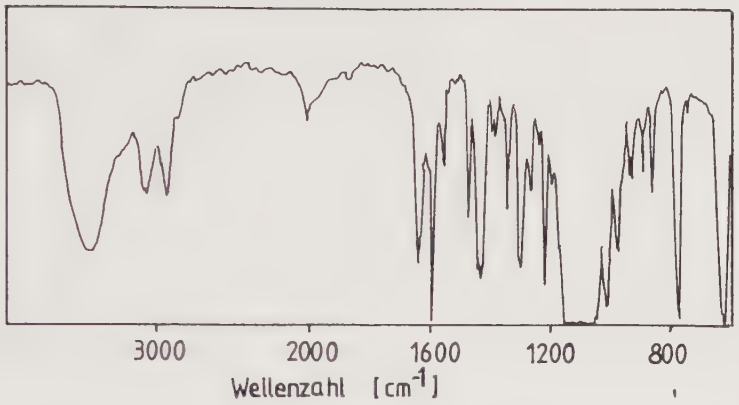


Abb.16 IR-Spektrum von $CuL_{1.3py}(ClO_4)_2$ V

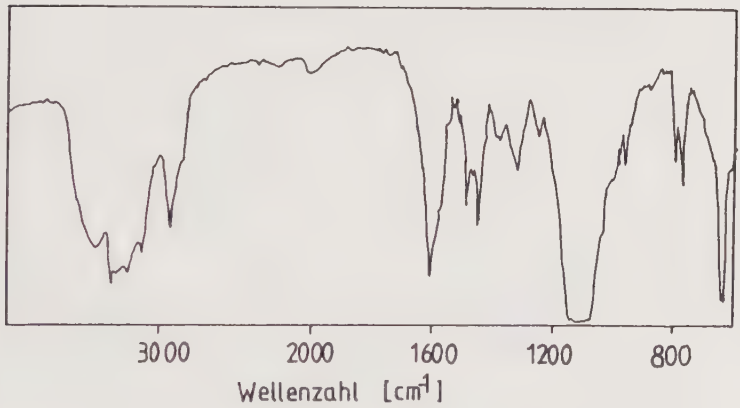


Abb.17 IR-Spektrum von $CuL_{NHpy}ClO_4)_2 \times 1/2\ H_2O$ VI

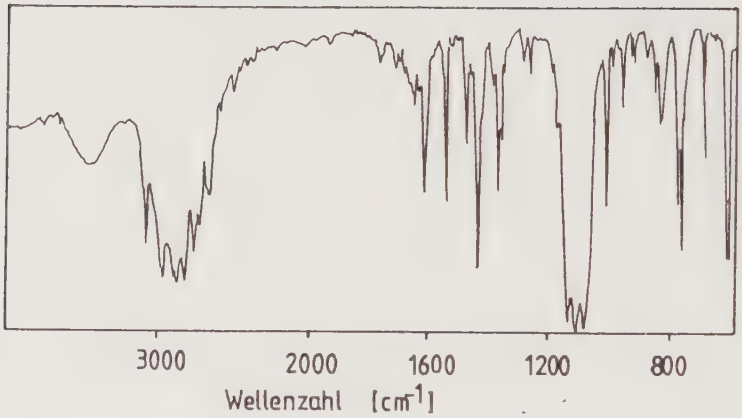


Abb. 18 IR-Spektrum von $CuL_{1.4im}(ClO_4)_2 \times 1/2H_2O$ VII

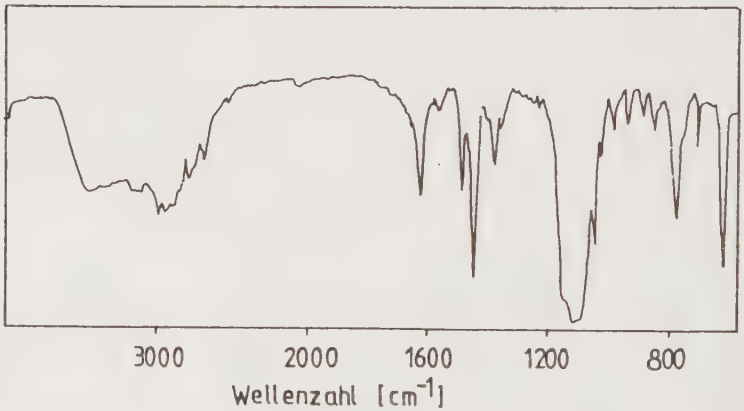
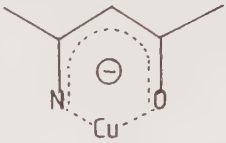


Abb. 19 IR-Spektrum von $CuL_{1.3im}(ClO_4)_2 \times 1.5H_2O$ VIII

Tabelle 4 : Hauptbanden der Infrarotspektren der Cu-Komplexe I-VIII in cm^{-1}

	ν_{N-H}	$\nu_{C=N}$	$\nu_{C=O}$	$\nu_{C=C}$	$\nu_{ClO_4^-}$	$\nu_{NO_3^-}$
I $CuL_{py}ClO_4 \times H_2O$		1590 st	1540 sst	1525 sst	1100 sst,breit 625	
II $CuL_{py}NO_3 \times H_2O$		1590 st	1545 sst	1525 sst		1380sst 840schw.
III $CuL_{hm}ClO_4 \times H_2O$	3325 st 3265 st	1595 st	1545 sst	1525 sst	1100 sst,breit 625	
IV $CuL_{1.4py}(ClO_4)_2 \times 1/2H_2O$		1635 st		1595 sst	1100 sst,breit 625 st	
V $CuL_{1.3py}(ClO_4)_2$		1645 st		1600 sst	1100 sst,breit 625 st	
VI $CuL_{NHpy}(ClO_4)_2 \times 1/2H_2O$	3330 st 3200 st					
VII $CuL_{1.4im}(ClO_4)_2 \times 1/2H_2O$	2900- 2400 st	1615 sst		1550 st	1100 sst,breit 625 st	
VIII $CuL_{1.3im}(ClO_4)_2 \times 1.5H_2O$	2900- 2400 st	1615 sst		1540 st	1100 sst,breit 625 st	

Die Banden im Bereich von 1595-1525 cm^{-1} der Verbindungen I-III sind charakteristisch für einen mesomeriestabilisierten, 6-gliedrigen Kupferchelatring eines komplexierten Ketoimins |72|.



Isolierte C=O- und C=N-Valenzschwingungen wären bei höheren Wellenzahlen zu erwarten. Durch Konjugation wird die Bindungsstärke herabgesetzt und die funktionelle Gruppe absorbiert somit bei niedrigerer Energie. Das konjugierte System der Verbindungen IV-VIII ist nicht so ausgedehnt wie in I-III. Die C=N-Schwingung erscheint folglich nach höheren Wellenzahlen verschoben, um 164o cm^{-1} für IV und V bzw. bei 1615 cm^{-1} für VII und VIII. Die Spektren der Homologen IV/V und VII/VIII sind nahezu identisch. Das Bandenmuster der N-H-Valenzen von VII und VIII im Bereich von 29oo-24oo cm^{-1} deutet auf starke Wasserstoffbrücken durch Assoziation von Wasser hin. Das IR-Spektrum gibt auch Aufschluß über die Art der Anionenbildung. Die breite und sehr intensive Absorption bei 11oo cm^{-1} und die mittelstarke bei 625 cm^{-1} entsprechen den Normalschwingungen ν_3 und ν_4 von ClO_4^-. Sie zeigen an, daß das Anion nicht direkt an das Metall gebunden ist. Eine Koordination würde die Symmetrie des Perchlorats von T_d nach C_{3v} erniedrigen und zu einer Aufspaltung der Banden führen. Auch das Nitrat in Verbindung III liegt rein ionisch vor, wie die Absorptionen bei 138o cm^{-1} und 84o cm^{-1} belegen |73|.

3.1.4 UV/vis-Spektroskopie

Die breiten Absorptionsbanden im sichtbaren Bereich um 62o nm sind typisch für d-d-Übergänge von Cu(II) in einem schwachen tetragonalen Feld.

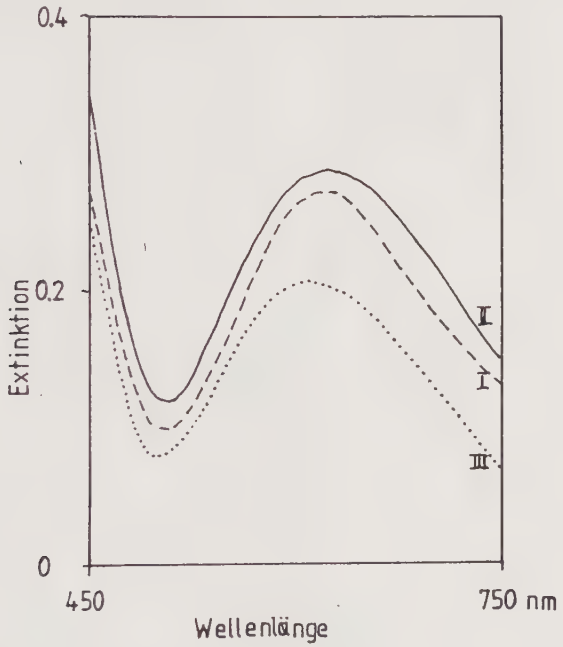


Abb. 2oa

Elektronenabsorption der Komplexe I-III im sichtbaren Bereich ----I, $CuL_{py}ClO_4 \times H_2O$;—$CuL_{py}NO_3 \times H_2O$; ····· III, $CuL_{hm}ClO_4 \times H_2O$

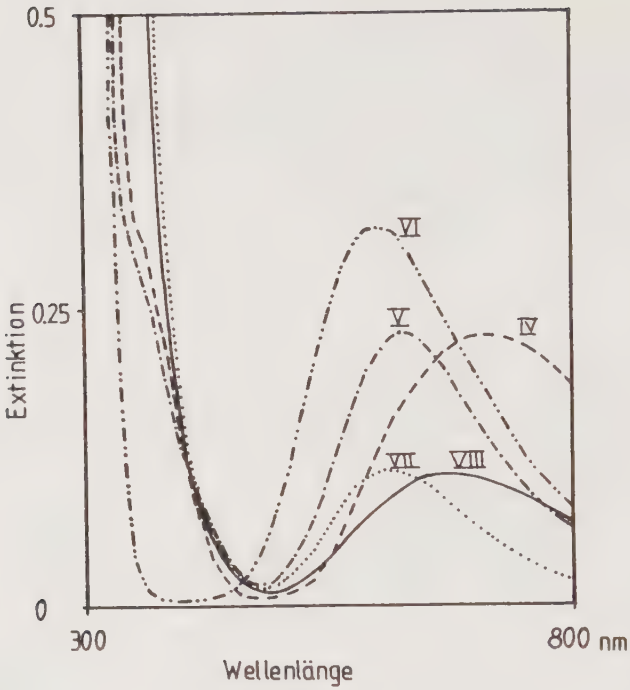


Abb.2ob:

Elektronenabsorption der Komplexe IV-VIII im sichtbaren Bereich.

IV, $CuL_{1.4py}(ClO_4)_2 \times 1/2H_2O$, V, $CuL_{1.3py}(ClO_4)_2$,
VI, $CuL_{NHpy}(ClO_4)_2 \times 1/2H_2O$, VII, $CuL_{1.4im}(ClO_4)_2 \times 1/2H_2O$
VIII, $CuL_{1.3im}(ClO_4)_2 \times 1.5H_2O$

Bei Verbindung IV, dem Di-Schiffbasekomplex ist eine deutliche Rotverschiebung um 9o nm zu beobachten. Das Maximum liegt bei 71o nm und ist vergleichbar mit der Cu_2Zn_2-Superoxiddismutase bei 68o nm und der Cu_2E_2-Superoxiddismutase - dessen Zinkbindungsstelle leer ist - bei 74o nm. Wird das Spektrum von IV in Methanol aufgenommen, ändert sich die Lage des Maximums nicht, jedoch steigt der Extinktionskoeffizient auf 15o.

Komplex IV zeigt eine deutliche Schulter bei 36o nm. Diese ist vermutlich einem Cu(II)$N(\pi^*)$-Charge Transfer-übergang zuzuordnen |84|.

Im ultravioletten Bereich dominieren die intensiven Übergänge der aromatischen π-Elektronen und sind bei der ausgedehnten Konjugation der Verbindungen I-III längerwellig verschoben. Sie überlagern die ebenfalls in diesem Bereich zu erwartenden N(π) ⟶ Cu(II) Charge Transferübergänge.

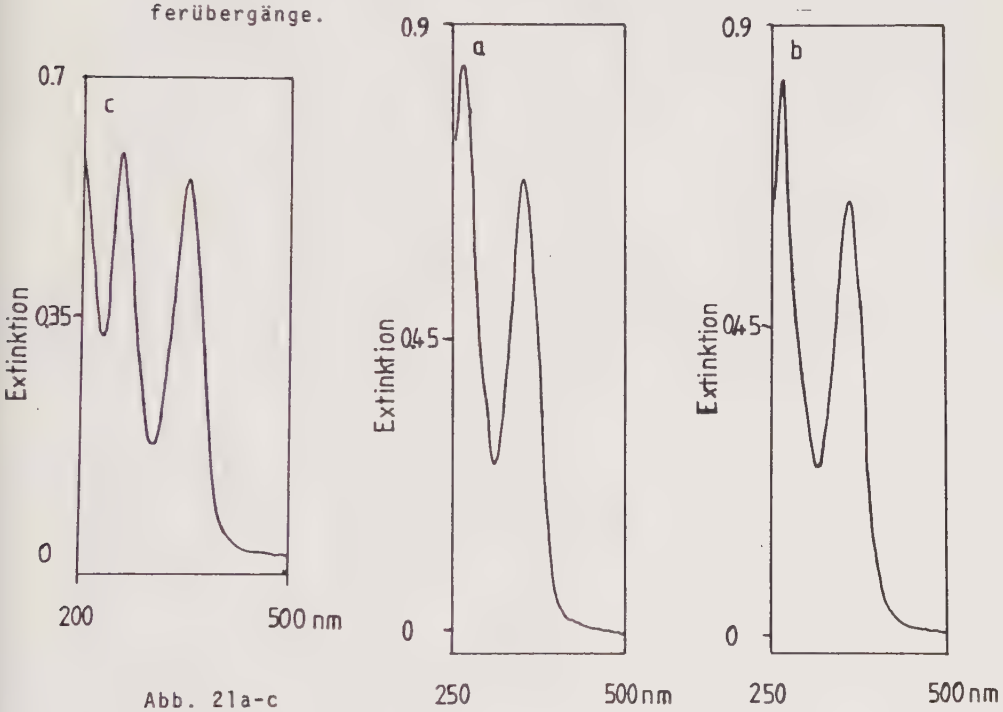
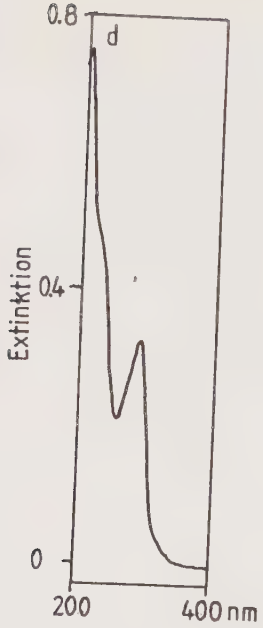
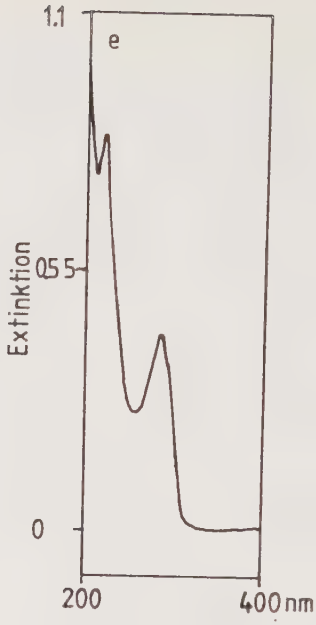
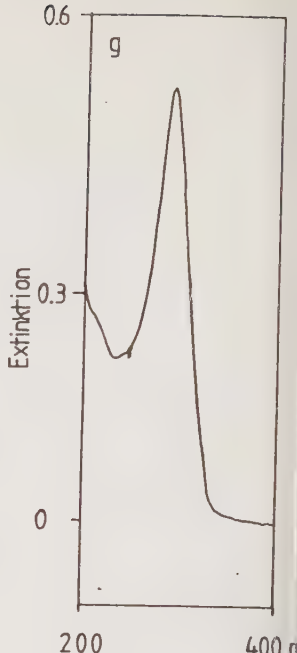
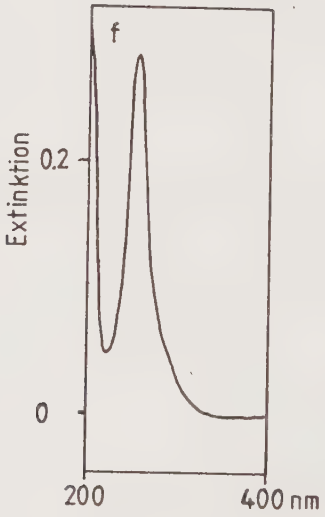


Abb. 21a-c
UV-Spektren der Komplexe I-III.
a) I, $CuL_{py}ClO_4 \times H_2O$
b) II, $CuL_{py}NO_3 \times H_2O$
c) III, $CuL_{hm}ClO_4 \times H_2O$









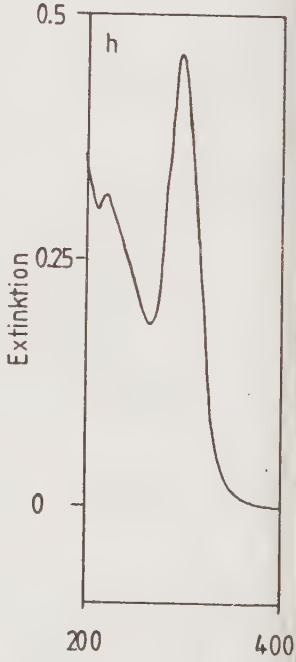


Abb. 21d-h

UV-Spektren der Komplexe d-h, VI-VIII

d) IV, $CuL_{1.4py}(ClO_4)_2 \times 1/2H_2O$

e) V, $CuL_{1.3py}(ClO_4)_2$

f) VI, $CuL_{NHpy}(ClO_4)_2 \times 1/2H_2O$

g) VII, $CuL_{1.4im}(ClO_4)_2 \times 1/2H_2O$

h) VIII, $CuL_{1.3im}(ClO_4)_2 \times 1.5H_2O$

Tabelle 5: Absorptionsmaxima der Elektronenübergänge der Cu-Komplexe I-VIII, Wellenlänge λ_{max} in nm, in Klammern Extinktionskoeffizient

	Lösungsmittel	λ_{max} in nm, (ε)
I $CuL_{py}ClO_4 \times H_2O$	MeOH	62o (82)
		355 (1952o), 261 (2388o)
II $CuL_{py}NO_3 \times H_2O$	MeOH	625 (9o)
		355 (1968o), 261 (2381o)
III $CuL_{hm}ClO_4 \times H_2O$	MeOH	61o (75)
		35o (2o26o), 26o(2o37o)
IV $CuL_{1.4py}(ClO_4)_2 \times 1/2H_2O$	H_2O	71o (1o1)
		36osh (14o), 288 (1379o), 22osh (2177o)
V $CuL_{1.3py}ClO_4)_2$	H_2O	63o (8o)
		286 (1422o), 22o (266oo)
VI $CuL_{NHpy}(ClO_4)_2 \times 1/2H_2O$	H_2O	6oo (13o)
		255 (13617)
VII $CuL_{1.4im}(ClO_4)_2 \times 1/2H_2O$	H_2O	69o (35)
		29o (1776o)
VIII $CuL_{1.3im}(ClO_4)_2 \times 1.5H_2O$	H_2O	625 (35)
		3oo (17o5o)
Cu_2Zn_2-Superoxiddismutase	H_2O	68o (15o)
Cu_2E_2-Superoxiddismutase	H_2O	74o (14o)

3.1.5 EPR-Sprektroskopie

Der g-Faktor und die Kopplungskonstante A der Hyperfeinaufspaltung sind spezifische Parameter einer Verbindung und werden bestimmt von Art, Anzahl und Geometrie der Liganden und koordinierenden Atome und in geringerem Maße auch von der Ladung des Moleküls.

Alle EPR-Daten der Verbindungen (Tabelle 6) sind typisch für tetragonale Kupferkomplexe im $d_{x^2-y^2}$-Grundzustand. Das N_2O_2-Donorset der Verbindungen I-III wird gebildet aus einem dreizähnigen Liganden mit zwei Stickstoffen und einem Sauerstoffatom und einem Wassermolekül, das die vierte Koordinationsstelle am Kupfer besetzt. Die g-Werte um 2.o5 dieser Komplexe mit der größeren Elektronegativität des Liganden liegen höher als die g-Werte von ca. 2.o4 der niedermolekularen Komplexe mit vier koordinierten Stickstoffatomen IV-VIII. Die kleineren g-Werte deuten auf einen ansteigenden nephelauxetischen Effekt |75| und damit eine höhere Kovalenz der Metall-Ligandbindungen hin. Es fällt auf, daß der g-Wert von 2.196 für VI, das zwei gesättigte und zwei ungesättigte Stickstoffe besitzt, eindeutig niedriger liegt als der Wert der Verbindung IV, g=2.226 und zum Unterschied zu VI vier ungesättigte Stickstoffatome aufweist. Dieser Trend wird auch von Untersuchungen an ähnlichen Komplexen bestätigt |17,76-8o|.

Die Parameter der Verbindungen mit einem N_4-Donorset - die niedermolekularen Komplexe IV-VIII, einschließlich des enzymgebundenen Kupfers - variieren über einen relativ weiten Bereich. In diesem Fall werden die g-und A-Werte in der Hauptsache von der Koordinationsgeometrie beeinflußt. Es ist bekannt, daß ein Übergang von quadratisch planarer nach verzerrt tetraedrischer Koordination ein Ansteigen des g-Wertes und ein Abnehmen der Kopplungskonstante A bewirkt |76,79,81-83|. Im allgemeinen besteht zwischen dem Ansteigen von g und der Abnahme von A eine lineare Abhängigkeit. Der Quotient g/A gilt als

empirisches Maß für eine tetraedrische Verzerrung einer planaren Anordnung |8o|. Im Bereich von 1o5-135 cm besitzen die Komplexe eine quadratisch planare Umgebung. Ein Wert bis zu 25o cm wird einer tetraedrischen Verzerrung zugeordnet. Das native Enzym weist den größten Verzerrungsgrad auf. Im zinkfreien Protein ist die Verzerrung schon etwas vermindert. Dies unterstreicht die Rolle des Zinks, das aktive Zentrum in einer bestimmten Konformation zu halten. Die Modelle IV und VII kommen mit einer beginnenden tetraedrischen Verzerrung, angezeigt durch das g/A-Verhältnis von 135 cm dieser Anordnung schon recht nahe. Verblüffend ist auch der niedrige g/A-Betrag von 115 cm für Komplex VI. Eine Verkleinerung des Bindungswinkels der gesättigten Aminstickstoffe von ca. 1o4° mit VI, im Gegensatz zu ca. 12o° der ungesättigten Azomethinstickstoffe in IV gewährleistet offensichtlich eine vollkommen quadratisch planare Umgebung des Zentralatoms.

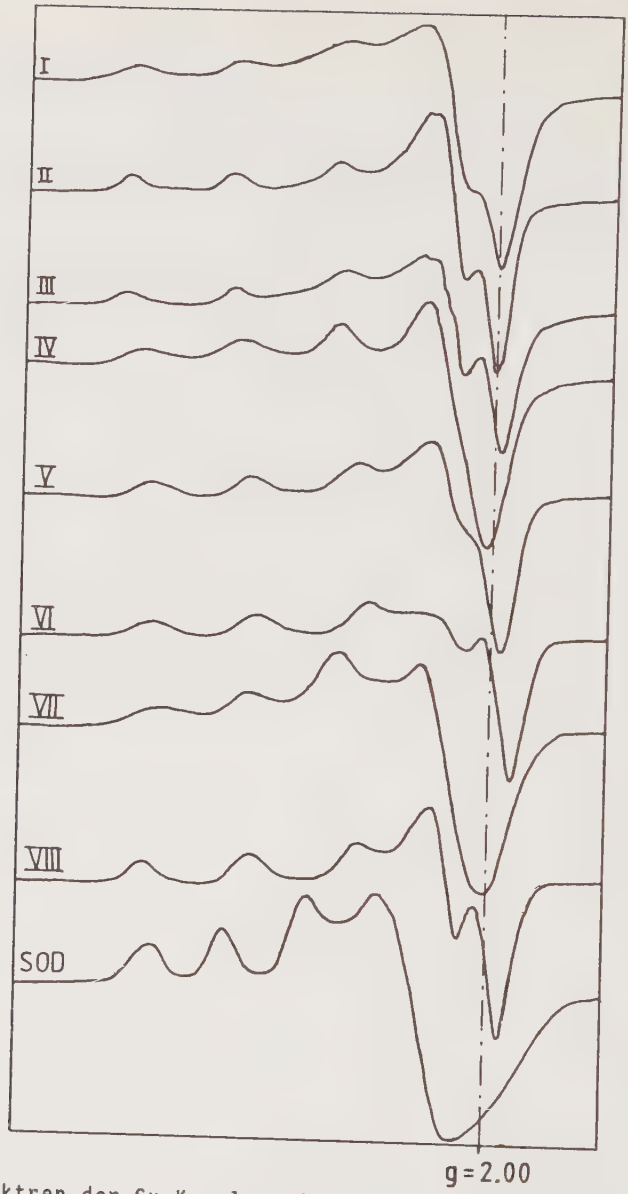


Abb. 22

EPR-Spektren der Cu-Komplexe I-VIII und Cu_2Zn_2-Superoxiddismutase.

I. $CuL_{py}ClO_4 \times H_2O$ II. $CuL_{py}NO_3 \times H_2O$
III. $CuL_{hm}ClO_4 \times H_2O$ IV. $CuL_{1.4py}(ClO_4)_2 \times 1/2H_2O$
V. $CuL_{1.3py}(ClO_4)_2$ VI. $CuL_{NHpy}(ClO_4)_2 \times 1/2H_2O$
VII. $CuL_{1.4im}(ClO_4)_2 \times 1/2H_2O$
VIII. $CuL_{1.2im}(ClO_4)_2 \times 1.5H_2O$

Tabelle 6: EPR-Parameter der Cu-Komplexe I-VIII, Cu_2Zn_2- und Cu_2E_2-Superoxiddismutase

	$g_\perp$	$g_\parallel$	$A_\parallel$ [G]	$A_\parallel$ 10^{-4}x[cm^{-1}]	$\left\|\frac{g_\parallel}{A_\parallel}\right\|$
Donorset: N_2O_2					
I $CuL_{py}ClO_4 \times H_2O$	2.056	2.239	175	183	122
II $CuL_{py}NO_3 \times H_2O$	2.049	2.242	178	186	120
III $CuL_{hm}ClO_4 \times H_2O$	2.049	2.239	183	191	117
Donorset: N_4					
IV $CuL_{1.4py}(ClO_4)_2 \times 1/2H_2O$	2.040	2.226	160	166	134
V $CuL_{1.3py}(ClO_4)_2$	2.036	2.210	177	183	121
VI $CuL_{NHpy}(ClO_4)_2 \times 1/2H_2O$	2.037	2.196	186	191	115
VII $CuL_{1.4im}(ClO_4)_2 \times 1/2H_2O$	2.047	2.234	160	166	134
VIII $CuL_{1.3im}(ClO_4)_2 \times 1.5H_2O$	2.043	2.206	185	190	116
Cu_2Zn_2-Superoxiddismutase [74]	2.087	2.268	134	142	160
Cu_2E_2-Superoxiddismutase [15]	2.067	2.268	146	155	146

3.1.6 Cyclische Voltammetrie

Da im Enzymmechanismus der Redoxwechsel zwischen Cu^{2+} und Cu^{+} eine Rolle spielt, ist es wichtig, das elektrochemische Verhalten der Modelle näher zu betrachten. Die Voltammogramme der Komplexe IV-VI bei mittlerer Vorschubgeschwindigkeit sind in Abb.23 dargestellt.

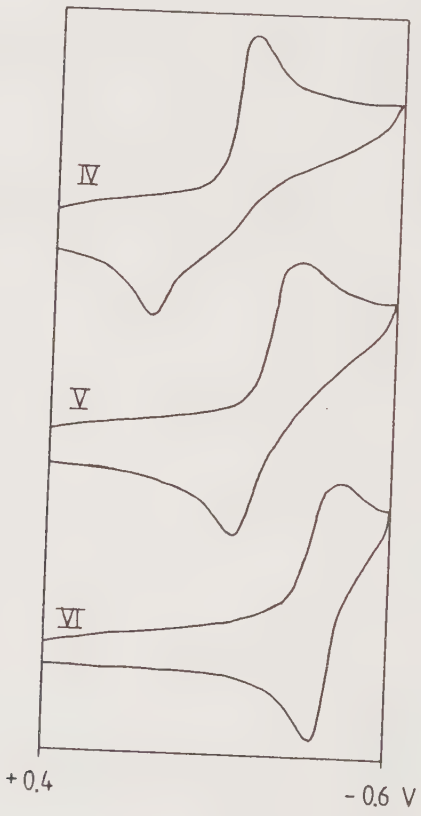


Abb.23

Cyclische Voltammogramme der Komplexe IV, $CuL_{1.4py}(ClO_4)_2 \times 1/2H_2O$, V, $CuL_{1.3py}(ClO_4)_2$

Die Verbindungen IV und V besitzen jeweils das gleiche Donorset von vier ungesättigten Stickstoffatomen und unterscheiden sich nur in der Anzahl der Methylengruppen. Komplex IV, dessen Ligand mit vier Methylengruppen eine flexible Geometrie zwischen quadratisch planar und tetraedrisch zuläßt, d.h. von seinen Strukturmerkmalen her dem nativen Enzym am ähnlichsten ist, besitzt auch ein relativ hohes Redoxpotential von +o.21V. Es liegt damit sehr nahe dem Redoxpotential von +o.27V der Cu_2Zn_2-Superoxiddismutase |21|. In Komplex V, mit drei Methylengruppen wird das Zentralatom starr in quadratisch planarer Position festgehalten. Dies bewirkt eine deutliche Verschiebung zu negativen Werten um o.2V zu +o.olV

Neben der Flexibilität des Donorsets ist aber auch die Art der koordinierenden Atome entscheidend für die Lage des Redoxpotentials. Der Ligand von Komplex VI besitzt zwei ungesättigte Pyridinstickstoffe und zwei gesättigte Aminstickstoffe als Koordinationsstellen. Da Amine kaum π-Acceptorvermögen aufweisen, aber sehr feste σ-Donorbindungen eingehen, komplexieren sie bevorzugt Kupfer in der Oxidationsstufe +II. Ungesättigte Stickstoffatome mit ausgewogenem σ-Donor-/π-Acceptorverhalten können beide Oxidationsstufen stabilisieren. Werden zwei der vier ungesättigten Stickstoffatome durch zwei gesättigte Stickstoffe substituiert, wie in Verbindung VI im Vergleich zu IV, verschiebt sich das Redoxpotential drastisch um o.4V zu negativeren Werten.

Die cyclischen Voltammogramme der Imidazolkomplexe VII und VIII (Abb.24) deuten auf ein kompliziertes elektrochemisches Verhalten hin. Oxidationspeak und Reduktionspeak liegen sehr weit auseinander. Das ist entweder zu interpretieren als ein stark irreversibles Nernstverhalten, d.h. der Elektronenübergang ist kinetisch gehemmt und damit sehr langsam. Der Redoxwechsel ist dann nicht mehr diffusionskontrolliert wie im reversiblen Fall. Oder aber nach dem elektrochemischen Prozeß folgt ein

chemischer Schritt. Ohne kompliziert quantitative Auswertung mit Hilfe einer Computersimulation ist die Lage des Redoxpotentials $E_{1/2}$ auf diesem Wege nicht sicher zu bestimmen.

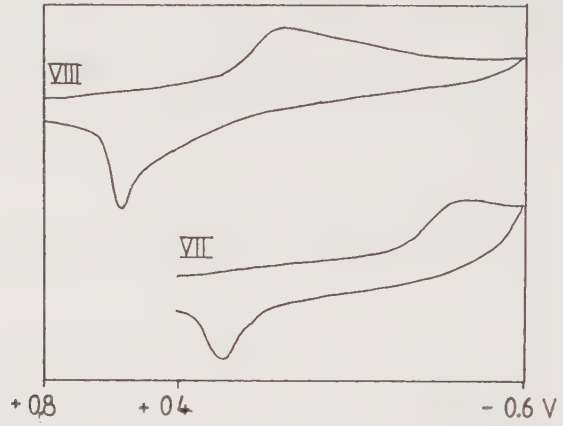


Abb.24: Cyclische Voltammogramme der Komplexe

VII, $CuL_{1.4im}(ClO_4)_2 \times 1/2H_2O$ und
VIII, $CuL_{1.3im}(ClO_4)_2 \times 1.5H_2O$;
Scanrate o.1V/S, C_{Cu}=2.4mM.

Tabelle 7: Redoxpotentiale der Cu-Komplexe IV-VI. Arbeitselektrode: Glaskohle, Bezugselektrode: Pt, Vergleichselektrode: ges.Kalomel ≙ o.244V

		$E_{1/2}$ [V] (SCE)	(NHE)
IV	$CuL_{1.4py}(ClO_4)_2 \times 1/2H_2O$	o.o3	+o.21
V	$CuL_{1.3py}(ClO_4)_2$	o.23	+o.o1
VI	$CuL_{NHpy}(ClO_4)_2 \times 1/2H_2O$	o.41	-o.17
	Cu_2Zn_2-Superoxiddismutase [21]		+o.27

3.1.7 Stabilität der Komplexe

Große Stabilitätskonstanten von Übergangsmetallkomplexen lassen sich nicht direkt über ihre Bildungskurven ermitteln. Der Gehalt an freiem Ligand ist analytisch nicht mehr erfaßbar. Es stehen aber eine Reihe indirekter Methoden zur Verfügung |85|. Meßtechnisch am wenigsten aufwendig erscheint die spektroskopische Bestimmung nach der Theorie der "Corresponding Solutions" |86|, bei der zwei Metalle um einen Ligand konkurrieren. In Anlehnung an diese Theorie wurde in dieser Arbeit die Stabilität der Kupferkomplexe unter physiologischen Bedingungen bei pH 7.4 in 2o mM HEPES-Puffer im Vergleich zu Serumalbumin (BSA) ermittelt. Dabei konkurrieren zwei Liganden um ein Metall. Die Wechselwirkung des Kupfers mit dem Puffer kann vernachlässigt werden. Serumalbumin besitzt eine spezifische Kupferbindungsstelle |87|. Erst wenn sich die Kupferkonzentration der des Serumalbumins nähert, wird Kupfer an weitere Bindungsstellen geringerer Affinität gebunden |88|. Die Bindungskonstante der zweiten Bindungsstelle ist um den Faktor 87ooo geringer als die der ersten. In Tabelle 8 sind die relativen Stabilitätskonstanten der Komplexe IV-VIII gegenüber physiologischen Mengen Serumalbumin zusammengefaßt.

Tabelle 8: Relative Stabilitäten der Komplexe IV-VIII gegenüber Serumalbumin

		β_{rel}	$\frac{1}{\beta_{rel}}$
IV	$CuL_{1.4py}(ClO_4)_2 \times 1/2H_2O$	1.17	o.85
V	$CuL_{1.3py}(ClO_4)_2$	o.2o	5
VI	$CuL_{NHpy}(ClO_4)_2 \times 1/2H_2O$	o.o5	2o
VII	$CuL_{1.4.im}(ClO_4)_2 \times 1/2H_2O$	o.5o	2
VIII	$CuL_{1.3im}(ClO_4)_2 \times 1.5H_2O$	o.12	8.3

Zur Bestimmung der relativen Stabilität wurde Rinderserumalbumin verwendet. Die spezifische Kupferbindungsstelle am N-terminalen Ende ist identisch mit der von Humanserumalbumin |89,9o|, von der die Komplexbildungskonstante bekannt ist |89|. Der Rest des Proteins hat keinerlei Einfluß auf die spektroskopischen Eigenschaften der Kupferbindungsstelle. Es ist daher erlaubt, anzunehmen, daß mögliche geringe Unterschiede der Komplexbildungskonstanten von Rinder- und Humanserumalbumin innerhalb der Meßgenauigkeit liegen. Nach Gleichung (7) kann über die relative Stabilität auch die absolute Stabilitätskonstante der Kupferkomplexe IV-VIII berechnet werden.

Tabelle 9: Absolute Stabilitätskonstanten der Komplexe IV-VIII. $K_{CuBSA}=1.51x10^{16}$, log $K_{CuBSA}=16.2$

		K_{CuL}	logK
IV	$CuL_{1.4py}(ClO_4)_2 \times 1/2H_2O$	$1.3 x10^{16}$	16.1
V	$CuL_{1.3py}(ClO_4)_2$	$4.67x10^{16}$	16.7
VI	$CuL_{NHpy}(ClO_4)_2 \times 1/2H_2O$	$3.21x10^{17}$	17.5
VII	$CuL_{1.4im}(ClO_4)_2 \times 1/2H_2O$	$1.18x10^{17}$	17.1
VIII	$CuL_{1.3im}(ClO_4)_2 \times 1.5H_2O$	$2.95x10^{16}$	16.5

Die elektronischen Verhältnisse der Stickstoffdonoratome hat auf die Stabilität einen größeren Einfluß als der Energiegewinn durch den Chelateffekt. Die größte Stabilität mit logK=17.5, zwanzig mal höher als Kupfer-Serumalbumin, hat Verbindung VI mit zwei gesättigten und zwei ungesättigten Stickstoffen als Donorset, obwohl mit der Tetramethylenbrücke keine Chelatbildung mehr möglich ist. VI ist stabilder als V mit logK=16.7 und VIII mit logK=16.5, bei denen die Trimethylenbrücke mit den beiden Iminstickstoffen und dem Kupfer ein 6-Ringchelat ausbilden. V ist fünfmal stabiler, VIII ist achtmal stabiler als der Kupfer-Serumalbuminkomplex. Hier zeigt

sich das bessere π-Donorverhalten des Imidazols gegenüber Pyridin. Die Imidazolkomplexe VII und VIII sind etwa um den Faktor zwei stabiler als die analogen Pyridinkomplexe IV und V.

3.1.8 Enzymaktivität der Komplexe

Als Maß für die enzymatische Aktivität wird die Kupferkonzentration angegeben, bei der die Formazanbildung im NBT-Test zu 5o% gehemmt wurde. Für das native Enzym liegt diese Konzentration bei o.o4 µM |7o|.

Tabelle 1o:

Superoxiddismutaseaktivität der Komplexe I-VIII, verglichen mit der des nativen Enzyms. o.5 ml des Testansatzes enthielten o.62 mM Nitrotetrazolium Blau, o.2% Gelatine, 5o µM Xanthin und o.18 µM Xanthinoxidase in 2o mM HEPES-Puffer. Cu-Komplexe in verschiedenen Konzentrationen.

		Konzentration an Cu(II) bei 5o% Hemmung der Formazanbildung, [µM]
	$Cu(Lys)_2$ |69|	86
	$Cu(Tyr)_y$ |69|	45
I	$CuL_{py}(ClO_4) \times H_2O$	29
II	$CuL_{py}(NO_3) \times H_2O$	24
III	$CuL_{hm}(ClO_4) \times H_2O$	13
IV	$CuL_{1.4py}(ClO_4)_2 \times 1/2H_2O$	1.2
V	$CuL_{1.3py}(ClO_4)_2$	1o
VI	$CuL_{NHpy}(ClO_4)_2 \times 1/2H_2O$	4
VII	$CuL_{1.4im}(ClO_4)_2 \times 1/2H_2O$	1.7
VIII	$CuL_{1.3im}(ClO_4)_2 \times 1.5H_2O$	25
	Cu_2Zn_2-Superoxiddismutase |7o|	o.o4

Die Kupferkomplexe I-III, V und VIII zeigen keine nennenswerte Aktivität, obwohl diese höher ist verglichen mit den Aminosäurekomplexen $Cu(Tyr)_2$ und $Cu(Lys)_2$ [69]. Dagegen eine 6o mal höhere Aktivität als $Cu(Lys)_2$ besitzen die Komplexe IV und VII mit einer Konzentration von 1.2 bzw. 1.7 µM bei 5o% Hemmung, und dies entspricht zu 3% der des nativen Proteins. Interessant ist ein Vergleich der Verbindungen IV und V, bzw. VII und VIII. Diese Komplexe unterscheiden sich untereinander in ihrer Struktur nur durch eine Methylengruppe und damit durch den Verlust an Flexibilität der Geometrie beim Redoxübergang. Die flexiblen Kupferkomplexe IV bzw. VII sind etwa um den Faktor lo aktiver als die starren Homologa V bzw. VIII.

3.2 Cu(I)Thioneinmodell

Cu(I)-Thiolatcluster lassen sich sowohl von Cu(II)- als auch von Cu(I)-Salzen ausgehend synthetisieren. Beim Einsatz von Cu(II)verbindungen nutzt man die reduzierende Wirkung der SH-Gruppe, die dabei selbst in ein Disulfid übergeht. Es entstehen daher immer molare Mengen an Disulfid, die unter Umständen die Isolierung des gewünschten Komplexes erschweren. Die elegantere Methode ist daher die direkte Umsetzung von einwertigem Kupfer mit dem Mercaptan. Allerdings ist die Auswahl an einfach zugänglichen und löslichen Cu(I)-Verbindungen nicht sehr groß. Es wurde ein Cu(I)-Acetonitrilkomplex eingesetzt, dessen Löslichkeit sich durch die Wahl des Gegenanions variieren läßt. Bei aliphatischen Mercaptanen ist es auch in nichtwäßrigen Systemen nicht einfach, die Bildung eines unlöslichen Polymeren zu unterdrükken. Es muß auf alle Fälle mit Ligandüberschuß gearbeitet werden, und auch die Wahl der Base zur Abspaltung des Sulfhydrylprotons ist entscheidend. In Komplexen mit aliphatischen Mercaptanen ist die Koordinationssphäre des Metalls mit zwei Thiolatschwefeln offensichtlich bereits abgesättigt. Die Elektronendichte von drei oder gar vier negativ geladenen Thiolatliganden um das Kupfer führt zu hoher gegenseitiger elektrostatischer Abstoßung und ist deshalb instabil. Bei aromatischen Mercaptanen kann die Elektronendichte um so mehr über den gesamten Liganden verteilt werden. Aromatische Thiole bilden deshalb leichter Cu_4S_6-Käfigstrukturen aus. Ein Dithiol mit geeignetem Abstand der beiden SH-Gruppen könnte durch einen Klammereffekt des Ligandgerüsts die Clusterstruktur und damit eine höhere Koordinationszahl stabilisieren, wie von I.Dance |51,56| postuliert wurde.

3.2.1 $(Me_4N)_2[Cu_4(C_8H_8\text{-}(CH_2\text{-}S)_2)_3]$

Aus den Bindungslängen und Bindungswinkeln bekannter aromatischer Cu-S-Adamantancluster wurde rekonstruiert, daß ein 1.4-Dithiol spannungsfrei koordinieren würde.

Es wurde deshalb 1.2-Bis(mercaptomethyl)-4.5-dimethylbenzol ausgewählt. Als Base zur Deprotonierung diente Triethylamin und als Gegenkation zum negativ geladenen Thiolatcluster wurde Tetramethylammoniumchlorid $(Me_4N)Cl$ verwendet. Schwierigkeiten entstanden bei der Cu(I)-Ausgangsverbindung, dem Cu(I)-Acetonitrilkomplex. Zuerst wurde er als Perchlorat eingesetzt. Aus der Reaktionslösung konnte nur Me_4NClO_4 isoliert werden. Erst nachdem das Perchlorat mit dem sauerstoffempfindlicheren aber besser löslichen Nitrat ausgetauscht wurde, konnte der Kupferthiolatkomplex sauber auskristallisieren. Die Elementaranalyse ergab ein Cu:S-Verhältnis von 2:3 und da pro Ligand zwei SH-Gruppen zur Verfügung stehen, ist es sehr wahrscheinlich, daß der Komplex in der bekannten Cu_4S_6-Adamantanstruktur vorliegt.

Tabelle 1o: Charakteristische Frequenzen, $[cm^{-1}]$
$(Me_4N)_2[Cu_4(C_8H_8\text{-}(CH_2\text{-}S)_2)_3]$

υ_{CH}aromat.	3oo5 st
υ_{CH}-aliphat.	287o sst
	282o sst
	2795 st
$\upsilon_{C=C}$-aromat.	15oo sst
	148o sst
	145o sst
δ_{CH}-aliph.	1375 st

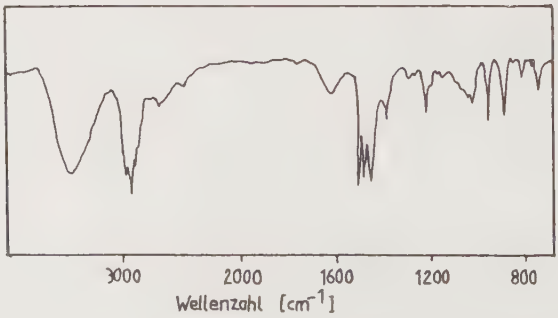


Abb. 25: Infrarotspektrum von $(Me_4N)_2[Cu_4(C_8H_8\text{-}(CH_2\text{-}S)_2)_3]$

3.3 Zur Problematik niedermolekularer Modelle von Cu-Proteinen

Neben der "in vitro"-Chemie, in der die Modelle ihren Beitrag zur Struktur- und Mechanismusaufklärung des Enzyms leisten, sollte ein weiteres Ziel, der Einsatz in biologischen Systemen nicht aus den Augen verloren werden. Die enzymatische Aktivität "in vitro" von Komplex IV ist zwar bereits 6o mal höher als die von Kupferacetaten oder Kupferaminosäurekomplexen, aber die geringe biologische Stabilität ist ein Nachteil. Es ist daher sicher lohnend, an der Entwicklung stabilerer Komplexe zu arbeiten. Zum Beispiel könnten dann solche Verbindungen als Antirheumatika dienen, um die für entzündliche Prozesse verantwortliche Sauerstoffradikale abzufangen. Ein anderes Problem ist die Kompartimentierung. Ebenso wie die Superoxiddismutase im Cytosol kompartimentiert vorliegt, sollte ein immunverträglicher polymerer Träger gefunden werden, der den Komplex bindet. Durch eine gute Membrangängigkeit könnte das Enzymmodell zu $O_2^{\cdot-}$-generierenden biologischen Prozessen gelangen und somit das physiologische Gleichgewicht empfindlich stören. Auf der anderen Seite könnte aber auch die Membrangängigkeit und die gute Lipidlöslichkeit des Kupferkomplexes, bedingt durch den aromatischen Anteil des Liganden, dazu genutzt werden, die Membrane vor Lipidperoxidation zu schützen.

Die Cu(I)-Thioneinmodelle sind von den vielschichtigen Einsatzmöglichkeiten der Superoxiddismutasemodelle noch weit entfernt. Da die biologische Funktion der Metallothioneine nicht bekannt ist, beschränkt sich die Modellchemie auf die Synthese effektiver Strukturmodelle. Bis jetzt wird vorwiegend in nichtwäßrigem Medium mit hydrophoben Liganden gearbeitet. Die Stabilität der mehrkernigen Komplexe in Lösung ist sehr gering. In wäßriger Lösung würde Cu(I) sofort disproportionieren, aber auch in organischen Lösungsmitteln muß stets ein Ligand-Überschuß vorhanden sein, da sonst das unlösliche (1:1)-Polymere ausfallen würde.

4. ZUSAMMENFASSUNG

4.1 Cu_2Zn_2-Superoxiddismutasemodelle

Es werden verschiedene Synthesewege zur Darstellung strukturanaloger Modelle des aktiven Zentrums der Cu_2Zn_2-Superoxiddismutase diskutiert. Das Design beschränkt sich auf mononukleare, stickstoffkoordinierte Kupferkomplexe, da allein das Kupfer für die enzymatische Funktion essentiell ist. Die Präparation dieser Komplexe wird beschrieben. Die physiko-chemischen Eigenschaften werden charakterisiert anhand von Infrarotspektrometrie, Elektronenabsorption im ultravioletten und sichtbaren Bereich, paramagnetische Elektronenspinresonanz, cyclischer Voltammetrie und verglichen mit denen des nativen Proteins. Die Superoxiddismutaseaktivität wird bestimmt mit dem Nitrotetrazoliumblautest. In Tabelle 12 sind noch einmal die wichtigsten Ergebnisse zusammengefaßt.

Um die intramolekulare Hydroxymethylierung der Dicarbonylverbindung zu unterdrücken, muß die Kondensation des Diketons mit einem primären Amin als Templatreaktion durchgeführt werden. Unter diesen Bedingungen wird aber nur eine der beiden C=O-Gruppen umgesetzt. So entstanden die Komplexe I-III $CuL_{py}ClO_4 \times H_2O$, $CuL_{py}NO_3 \times H_2O$ und $CuL_{hm}ClO_4 \times H_2O$ mit einem N_2O_2-Donorset. Durch die Kondensation eines Diamins mit einer Carbonylverbindung wurden die Komplexe IV-VIII $CuL_{1.4py}(ClO_4)_2 \times 1/2H_2O$, $CuL_{1.3py}(ClO_4)_2$, $CuL_{NHpy}(ClO_4)_2 \times 1/2H_2O$, $CuL_{1.4im}(ClO_4)_2 \times 1/2H_2O$ und $CuL_{1.3im}(ClO_4)_2 \times 1.5H_2O$ hergestellt. Sie sind wie das Kupfer der Cu_2Zn_2-Superoxiddismutase vierfach von Stickstoff umgeben.

Die Flexibilität der Koordinationsgeometrie wirkt sich entscheidend auf das Redoxpotential aus. In Komplex V, das eine Methylengruppe weniger besitzt als IV, wird das Zentralion starr in quadratisch planarer Anordnung festgehalten. Dadurch wird der Energieinhalt der Oxidationsstufe +I erhöht, und das Redoxpotential verschiebt sich

dadurch um o.2V zu negativen Werten. Auch die Art der Hybridisierung der koordinierenden Stickstoffatome beeinflußt stark das Redoxpotential. Bei Komplex VI wurden die beiden Azomethingruppen zu sec. Aminen reduziert. Gesättigte Stickstoffe stabilisieren die Oxidationsstufe +II, so daß das Redoxpotential von VI im Vergleich zu IV um o.38V ins Negative verschoben ist.

Die Enzymaktivität der flexiblen Strukturanaloga IV und VIII liegt um eine Größenordnung höher als die der starren Verbindungen V und VIII, die keine nennenswerte Aktivität zeigen. Ebensowenig wie die Komplexe I-III, die mit ihrem N_2O_2-Donorset auch in der Struktur vom Protein abweichen.

Interessant im Hinblick auf einen therapeutischen Einsatz von Kupferkomplexen ist die Komplexstabilität in physiologischem Medium. Es wurde die Stabilität in Gegenwart von physiologischen Mengen Serumalbumin (6oo µM) ermittelt, das auch eine spezifische Kupferbindungsstelle besitzt und somit mit dem Komplexliganden um das Metall konkurriert. Die Stabilität der niedermolekularen Verbindungen liegen in der gleichen Größenordnung wie der Kupferserumalbuminkomplex, um logK=16

Als bestes Modell der dargestellten Komplexe I-VIII erwies sich die Verbindung IV, $CuL_{1.4py}(ClO_4)_2 \times 1/2H_2O$, das in allen gemessenen Parametern dem nativen Protein am ähnlichsten ist. Der Quotient g/A aus dem EPR-Spektron von 134 cm deutet auf eine beginnende tetraedrische Verzerrung der tetragonalen Anordnung hin im Vergleich zu g/A =16o cm beim Enyzm, die einen höheren Grad der Verzerrung aufweist. Die Elektronenabsorption der d-d-Übergänge im sichtbaren Bereich unterscheiden sich nur um 3o nm; 71o nm bei IV bzw. 68o nm bei der Superoxiddismutase. Verblüffend ist das für eine niedermolekulare Kupferverbindung relativ hohe Redoxpotential von +o.21V, das den +o.27V des Proteins schon sehr nahe

kommt. Die Enzymaktivität erreicht nur zu 3% die Aktivität des Enzyms im NBT-Test. Das liegt unter anderem auch an den besonderen Ladungsverhältnissen des Proteins, das das Substrat über elektrostatische Anziehung direkt zum Reaktionszentrum hinführt.

4.2 Cu(I)-Thioneinmodell

Es wird ein Kupferkomplex mit dem aliphatischen Dithiol 1.2-Bis(mercaptomethyl)-4.5-dimethylbenzol beschrieben. Die Elementaranalyse ergibt ein Cu:S-Verhältnis von 2:3 und da der Ligand zwei Thiolatgruppen beisteuert, ist eine Cu_4S_6-Stöchiometrie in der bekannten adamantanähnlichen Struktur wahrscheinlich. Dies bedeutet, daß in einem niedermolekularen, aliphatischen Cu(I)-Thiolatcluster das Metall von drei Mercaptidschwefeln umgeben ist.

Tabelle 12: Zusammenfassung der wichtigsten Meßergebnisse der Komplexe I-VIII und Cu_2Zn_2-Superoxiddismutase

	vis-Absorp.	EPR				Redox-	Stabilit.		SOD-Aktiv.
	λ_{max}[nm] (ε)	$g_\perp$	$g_\parallel$	$A_\parallel$ $10^{-4}xcm^{-1}$	$\frac{g}{A}$	potent. $E_{1/2}$[V], NHE	$\frac{1}{\beta_{rel}}$	logK	(50%Hemmung) [µM]
N_2O_2-Donorset									
I $CuL_{py}ClO_4 \times H_2O$	620 (82)	2.053	2.239	183	122	---	- -		29
II $CuL_{py}NO_3 \times H_2O$	625 (90)	2.049	2.242	186	120	---	- -		24
III $CuL_{hm}ClO_4 \times H_2O$	610 (75)	2.049	2.239	191	117	---	- -		13
N_4-Donorset									
IV $CuL_{1.4py}(ClO_4)_2 \times 1/2H_2O$	710 (101)	2.040	2.226	166	134	+0.21	0.85	16.1	1.2
V $CuL_{1.3py}(ClO_4)_2$	630 (80)	2.036	2.210	183	121	+0.01	5	16.7	10
VI $CuL_{NHpy}(ClO_4)_2 \times 1/2H_2O$	600 (130)	2.037	2.196	191	115	-0.17	20	17.5	4
VII $CuL_{1.4im}(ClO_4)_2 \times 1/2H_2O$	690 (35)	2.047	2.234	166	134	---	2	17.1	1.7
VIII $CuL_{1.3im}(ClO_4)_2 \times 1.5H_2O$	625 (35)	2.043	2.206	190	116	---	8.3	16.5	25
Cu_2Zn_2-SOD	680 (150)	2.087	2.268	142	160	+0.27	-	-	0.04

5. LITERATUR

|1| Reinhammar, B. in "Advances in Inorganic Biochemistry" (Eichhorn, G.L., Mazilli, L.G., eds.(1979 Elsevier, North Holland, Vol1,91

|2| Bordas,J., Koch,M.H.J., Hartmann,H.J., Weser,U. (1982) FEBS Lett. 14o,19

|3| Hartmann,H.-J., Weser,U. (1985) Biochem. Biophys. Res.Commun. 132.277

|4| Mann,T., Keilin,D. (1939) Proc.R.Soc. London Ser. 126,3o3

|5| Markowitz,H., Cartwright,G.E., Wintrobe,M.M. (1959) J.Biol.Chem. 234,4o

|6| Kimmel,J.R., Markowitz,H., Brown,D.M. (1959) J.Biol.Chem. 234,46

|7| Porter,H., Folch,J. (1957) J.Neurochem. 1,26o

|8| Mohamed,M.S., Greenberg,D.M. (1953) J.Gen.Physiol. 37,433

|9| McCord,J.M., Fridovich,I. (1965) J.Biol.Chem. 244,6o49

|1o| Hartz,J.W., Funakoshi,S., Deutsch,H.F. (1973) Clin.Chim.Acta 46,125

|11| Evans,H.J., Steinman, H.M., Hill,R.L. (1974) J.Biol.Chem. 249,7315

|12| Tainer,J.A., Getzoff,E.D., Beem,K.M., Richardson, J.S., Richardson,D.C. (1982) J.Mol.Biol. 16o,181

|13| Tainer,J.A., Getzoff,E.D., Richardson,J.S., Richardson,D.C. (1983) Nature, 3o6,284

|14| Civalleri,L., Pini,C., Rigo,A. Federico,R., Calabrese,L., Rotilio,G. (1982) Mol.Cell.Biochem. 47,3

|15| Beem,K., Richardson,D.C., Rajagoplan,K.V. (1977) Biochemistry 16,193o

|16| Koppenol,W.H., in "Oxygen and Oxy-Radicals in Chemistry and Biology", (Rogers,M.A.J., Powers,E.L., eds.) (1981) Academic Press Inc. New York, p.671

|17| Blumberg,W.E., Peisach,J., Eisenberger,P., Fee,J.A. (1978) Biochemistry 17,1842

|18| Fielden,E.M., Roberts,P.B., Bray,R.C. Lowe,D.J. Mautner,G.N., Rotilio,G., Calabrese,L. (1974) Biochem. J. 139,49

|19| Klug,D., Rabani,J., Fridovich,I. (1972) J. Biol. Chem. 247, 4839

|2o| Pantoliano,M.W., McDonnell,P.J., Valentine,J.S. (1979) J.Am.Chem.Soc. lol,6454

|21| Lawrence,G.D., Sawyer,D.T. (1979) Biochemistry 18,3o45

|22| Morpurgo,L., Giovagnoli,C., Rotilio,G. (1973) Biochim. Biophys. Acta 322,2o4

|23| Fee,J.A., DiCorleto, G. (1973) Biochemistry 12,4893

|24| Prinz,R., Weser,U. (1975) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 356,767

|25| Weser,U., Hartmann,H.-J., Fretzdorf,A., Strobel, G.-J. (1977) Biochim. Biophys. Acta 493,465

|26| Kimura,M., Otaki,N., Hartmann,H.-J., Weser,U. (1981) Regard sur la Biochimie 3,lol

|27| Bordas,J., Koch,M.H.J., Hartmann,H.-J., Weser,U. (1983) Inorg.Chim. Acta 78,113

|28| Rupp,H., Weser,U. (1978) Biochim. Biophys. Acta 533,2o5

|29| Bordas,J., Koch,M.H.J., Hartmann,H.-J., Weser,U. (1982) FEBS Lett. 14o,19

|3o| Freedman,J.H., Powers,L., Peisach,J. (1986) Biochemistry 25,2342

|31| Johnson,G.F., Morell,A.G., Stochert,R.J. (1981) Hepatology (Baltimore) 1,243

|32| Kojima,Y., Kägi,J.H.R. (1978) Trends Biochem. Sci. 3,9o

|33| Lerch,K. (198o) Nature 284,368

|34| Hartmann,H.-J., Weser,U. (1981) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 362,8o7

|35| Goodwin, H.A., Lions,F. (196o) J.Am.Chem.Soc 82, 5o13

|36| Rabani,J., Klug-Roth,D., Lilie,J. (1973) J.Phys. Chem. 77,1169

|37| Joester,K.E., Jung,G, Weber,U., Weser,U. (1972) FEBS Lett 25,25

|38| Brigelius,R., Hartmann,H.-J., Bors,W., Weser,U. (1975) Z. Physiol. Chem. 356,739

|39| Weser,U., Richter,C., Wendel,A., Younes,M. (1978) Bioinorg. Chem. 8,2o1

|4o| Deuschle,U., Weser,U. (1984) Inorg.Chim. Acta

|41| Weser,U., Sellinger,K.-H., Lengfelder,E., Werner,W., Strähle,J. (198o) Biochim. Biophys. Acta, 631,232

|42| Younes,M., Lengfelder,E., Zienau,S., Weser,U. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 81,576

|43| O'Young,Ch.-L., Lippard,S.J. (198o) J. Am. Chem. Soc. 1o2,492o

|44| Fee,J.A., Briggs,R.G. (1975) Biochim.Biophys. Acta 4oo,439

|45| Strothkamp, K.G., Lippard,S.J. (1981) Biochemistry 2o,7488

|46| Holm,R.H., Ibers,J.A. (1977) in "Iron-Sulphur-Proteins", (Lovenberg,W., ed) Vol.3, Academic Press Inc., New-York, p.2o5

|47| Hartmann,H.-J., Rupp,H., Weser,U. (1979) in "Metalloproteins" (Weser,U.,ed.) Georg-Thieme-Verlag, Stgt., p.2o7

|48| Hollander,F.J., Coucouvanis,D. (1977) J.Am.Chem. Soc 99,6268

|49| Fackler,J.P. (1976) Prog.Inorg.Chem. 21,55

|5o| Lockyer,T.N., Martin,R.L. (198o) Prog.Inorg.Chem. 27,223

|51| Dance,I.G., Bowmaker,G.A., Clark,G.R., Seadon,J.K. (1983) Polyhedron 2,1o31

|52| Dance,I.G. (1976) J.Chem.Soc.Chem.Comm. 68

|53| Dance,I.G. (1976) J.Chem.Soc.Chem.Comm. 1o3

|54| Coucouvanis,D., Murphy,C.N., Kanodia,S.K. (198o) Inorg.Chem. 19,2992

|55| Vortisch,V., Kroneck,P., Hemmerich,P. (1976) J.Am.Chem.Soc. 98,2821

|56| Dance,I.G., Calabrese,I.C. (1976) Inorg.Chim.Acta 19,L41

|57| Gärtner,A., Hartmann,H.-J. Weser,U. (1984) Biochem. J. 221,549

|58| Knowles,P.F., Marsh,D., Rattle,H.W.E. in "Magnetic Resonance of Biomolecules" (1976) John Wiley and Sons, London

|59| Wopshall,R.H., Strain,I. (1967) Anal.Chem.39,1514

|6o| B7[1],275;7[2],449

|61| Sykes,P. "Reaktionsmechanismen in der org. Chemie" (1976) Verlag Chemie, Weinheim

|62| Thompson,M.C., Bush,D.H. (1962) J.Am.Chem.Soc. 84,1762

|63| Newkome,G.R., Sauer,J.D., Roper,J.M., Hager,D.C. (1977) Chem.Rev. 77,513

|64| Melson,G.A. "Coordination Chemistry of Macrocyclic Compounds", (1979) Plenum Press, New-York

|65| Karn,J.L., Bush,D.H. (1966) Natur 211,16o

|66| Karn,J.L., Bush,D.H. (1966) Inorg.Chem. 8,1149

|67| Rich,R.L., Stucky,G.L. (1965) Inorg.Nucl.Chem. Lett. 1,61

|68| Lindoy,L.F., Tokel,N.E., Anderson,L.E. Bush,D.H. (1971) J. Coord.Chem. 1,7

|69| Younes,M., Weser,U. (1976) FEBS Lett. 61,2o9

|7o| McCord,J.M., Fridovich,I. (1965) J.Biol.Chem. 244,6o49

|71| Sundberg,R.J., Martin,R.B. (1974) Chem.Rev. 74,471

|72| Nakamoto,J. "Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds", (1978) Wiley-Interscience, New-York

|73| Kimura,E., Sakonaka,A., Nakamoto,M. (1981) Biochim.Biophys.Acta 678,172

|74| Rotilio,G., Finazzi-Agro,A., Calabrese,L., Borsa,F., Guerrieri,P., Mondovi,B. (1971) Biochemistry 1o,616

|75| Basolo,F., Pearson,R.G. "Mechanismus in Inorganic Chemistry" (1967) Wiley-Interscience, New-York, p.112

|76| Yokoi,H., Addison,A.W. (1977) Inorg.Chem. 16,1341

|77| Yokoi,H. (1978) Inorg.Chem. 17,538

|78| Wilson,R.B., Wasson,J.R., Hartfield,W.E., Hodgson,D.J. (1978) Inorg.Chem. 17,641

|79| Sakaguchi,U., Addison,A.W. (1977) J.Am.Chem.Soc. 99,5189

|8o| Sakaguchi,U., Addison,A.W. (1979) J.Chem.Soc. Dalton Trans. 6oo

|81| Murakami,Y., Matsuda,Y., Sakata,K. (1971) Inorg.Chem. 1o,1728

|82| Choi,S.N., Bereman,R.D., Wasson,J.R. (1975) J.Inorg.Nucl.Chem. 37.2887

|83| Herring,F.G., Patmore,D.J., Storr,A. (1975) J.Am.Chem.Soc.Dalton Trans. 711

|84| Amundsen,A.R., Whelan,J., Bosnich,B. (1977) J.Am.Chem.Soc. 99,673o

|85| Rosotti,F.J.C., Rosotti,H. "The Determination of Stability Constants" (1961) McGraw-Hill, New-York

|86| Irving,H., Mellor,D.H. (1955) J.Chem.Soc. 3457

|87) Shearer,W.T., Bradshaw,R.A. Gurd,F.R.N., Peters,T. (1967) J.Biol.Chem. 242,5451

|88| Sarkar,B.S. in "Metal Ions in Biological Systems" (Sigel, H.,ed.) Vol.12 (1981) Marcel Dekker, New-York, p.233

|89| Lau,s., Sarkar,B. (1971) J.Biol.Chem. 246,5938

|9o| Peters,T., Blumenstock,F.A. (1967) J.Biol.Chem. 242,1574

LEBENSLAUF

28.11.1953	geboren in Bayreuth
1960 - 1964	Volksschule Kulmbach
1964 - 1970	Caspar-Fischer-Gymnasium Kulmbach
1970 - 1972	Fachoberschule Bayreuth Fachrichtung: Ingenieurwesen
1972 - 1977	Studium an der Fachhochschule Reutlingen Fachrichtung: Allg. Chemie Abschluß: Ing. (grad) Chemie
15.9.1972 - 12.3.1973	1. Industriesemester Bundesanstalt für Fleischforschung, Institut für Chemie und Physik, Kulmbach
1.4.1975 - 30.9.1975	2. Industriesemester WABAG-Wasserreinigungsbau, Kulmbach
1977 - 1982	Studium der Chemie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
1982	Diplomhauptprüfung und Diplomarbeit "Modelle des Cu-Bindungszentrums von Cu-Thionein" unter Anleitung von Prof. Dr. U. Weser, Physiologisch-chemisches Institut der Universität Tübingen

Januar 1983 - Juli 1986	Arbeit an der vorliegenden Dissertation "Strukturelle und funktionelle Aspekte einiger niedermolekularer Kupferkomplexe als Modelle der Metallbindungszentren von Cu_2Zn_2-Superoxiddismutase und Cu(I)-Thionein", unter Anleitung von Prof. Dr. U. Weser am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen
ab August 1986	angestellt bei Firma Siemens in München.

Meine akademische Ausbildung verdanke ich :

Anorganische Chemie:	J. Strähle, E. Lindner, J.-P. Lorenz, G. Pausewang, S. Kemmler-Sack
Organische Chemie:	E. Bayer, M. Hanack, G. Häfelinger, G. Jung, H. Stegmann, H. Hagenmaier
Physikalische Chemie:	F.F.Seelig, H. Oberhammer, D. Oelkrug
Anorganische Biochemie:	U. Weser